Leiden, 1962 THESIS Lane

GLUTAMINEZUURDECARBOXYLASE

EEN ONDERZOEK OVER EIGENSCHAPPEN EN LOCALISATIE IN HERSENWEEFSEL

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

A. J. C. HILGERSOM

GLUTAMINEZUURDECARBOXYLASE

EEN ONDERZOEK OVER EIGENSCHAPPEN EN LOCALISATIE IN HERSENWEEFSEL

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Dr. G. SEVENSTER, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 20 JUNI 1962 TE 15 UUR

DOOR

ADRIANUS JOHANNES CORNELIS HILGERSOM

GEBOREN TE LEIDEN IN 1930

DRUCO DRUKKERIJBEDRIJVEN - LEIDEN

Promotor: Prof. Dr. H. Veldstra

Aan mijn ouders

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/glutaminezuurdec0000ajch

INHOUD

		blz.
I	ALGEMENE INLEIDING	7
II	LITERATUUROVERZICHT	9
	1. Inleiding	9
	2. Concentratie van vrije aminozuren in de hersenen	9
	3. Vorming van GABA	10
	4. Metabolisme van GABA	11
	5. De rol van GABA en hiervan afgeleide derivaten in zenuwweefsel	13
	6. De GABA-concentratie in de hersenen	16
	Literatuur	18
III	ISOLERING EN ONDERZOEK NAAR ZUIVERING VAN HET GAD UIT HERSENWEEFSEL	23
	1. LITERATUUROVERZICHT	23
	1.1 GAD uit plantaardig weefsel	23
	1.2 GAD uit dierlijk weefsel	24
	2. ISOLERING VAN HET GAD EN ORIËNTERENDE PROEVEN	25
	2.1 Methodieken	25
	2.2 Activiteitsbepaling van homogenaten	27
	3. ONDERZOEK NAAR DE WERKING VAN -SH VERBINDINGEN OP HET GAD	29
	3.1 Literatuuroverzicht	29
	3.2 Experimenteel gedeelte	30
	4. POGINGEN TOT ZUIVERING VAN HET GAD	34
	4.1 Activiteit supernatant 105.000 g	34
	4.2 Zuivering door hitte-denaturering	35
	4.3 Ammoniumsulfaat-precipitatie van het GAD	36
	4.4 Precipitatie van het GAD bij pH 5.0	39
	5. ELECTROPHORESE PROEVEN	41
	5.1 Scheiding der eiwitten	41
	5.2 Bepaling eiwitconcentraties	42
	5.3 Activiteitsbepaling der fracties	42
	6. SAMENVATTING EN CONCLUSIES	44
	Literatuur	46

blz.

IV INTRACELLULAIRE LOCALISATIE VAN HET GAD IN HERSENWEEFSEL 47

1. Inleiding 47
2. Literatuuroverzicht 47
3. Methoden 48
4. Resultaten 49
5. Discussie 55
Literatuur 58

V INTERACTIE VAN ENIGE VERBINDINGEN MET HET GAD 59

1. Inleiding 59
2. Invloed van enige aminozuren en van het γ-aminoboterzuuramide op het GAD 59
3. Invloed van enige metaalbindende reagentia 62
4. Invloed van chloorpromazine en 2-aethyl-2-phenylglutaarimide op het GAD 63
Literatuur 67

VI INTERACTIE VAN HYDRAZIDES EN PYRIDOXALPHOSPHAATHYDRAZONEN MET HET GAD 68

1. INLEIDING 68

2. EXPERIMENTEEL GEDEELTE 70

2.1 Synthese van het benzoyl- en het isonicotinoylhydrazon van pyridoxalphosphaat 70
2.2 Bepaling van de GAD-activiteit bij toevoeging van enige hydrazonen 70
2.3 Remming van het GAD door hydrazides 71
Literatuur 75

VII CONCLUSIES EN SAMENVATTING 76

Summary 79

I ALGEMENE INLEIDING

In het kader van onderzoekingen op ons laboratorium over enzymatische decarboxyleringen, waarbij pharmacologisch actieve aminen worden gevormd, hebben wij van de betreffende enzymen, zoals het 5-hydroxytryptophaandecarboxylase, het dihydroxyphenylalaninedecarboxylase en het glutaminezuurdecarboxylase (GAD), het laatstgenoemde bestudeerd.

Bij deze reactie wordt het L-glutaminezuur omgezet in het γ-aminoboterzuur (GABA), waarbij het pyridoxalphosphaat, evenals bij de andere genoemde decarboxyleringen, als coenzym optreedt.

Het GABA kwam voor het eerst in het middelpunt der belangstelling te staan toen men dit aminozuur in hoge concentraties in de hersenen van verschillende dieren aantrof. Nadat bleek dat het voor de vorming van GABA verantwoordelijke GAD uitsluitend in hersenweefsel voorkomt en tevens aan GABA een rol werd toegeschreven bij de prikkeloverdracht in hersenweefsel, hebben vele onderzoekers zich met dit probleem bezig gehouden.

De belangrijke rol van het GAD blijkt tevens uit het feit dat experimenteel is aangetoond dat α-ketoglutaarzuur voor een zeer groot deel in de hersenen in een transamineringsreactie met GABA uiteindelijk tot barnsteenzuur wordt afgebroken.

Onze aandacht ging allereerst uit naar het reproduceren van GAD-activiteitsmetingen in hersenhomogenaten. Een standaardisering van onze methode van weefselisolatie, van opwerken van het materiaal en van meten der enzymatische activiteit was een eerste vereiste. Uitgaande van dit homogenaat hoopten wij een zuivering van het enzym te verkrijgen. In de literatuur zijn geen uitvoerige gegevens hierover bekend, hoewel kennelijk verschillende pogingen daartoe zijn gedaan.

Wij waren van plan dit te bereiken door enige klassieke methoden van enzymzuivering toe te passen, zoals ammoniumsulfaatprecipitaties, dialyse, warmte-denaturering van niet-actief eiwit en neerslaan van het eiwit door verandering van de zuurgraad.

Tevens hoopten wij electrophoretisch tot een scheiding van het enzym en het verontreinigende niet-actieve eiwit te geraken.

Ook over de intracellulaire localisatie van het GAD in hersenweefsel was bij de aanvang van ons onderzoek niets gepubliceerd. Een nader onderzoek in deze leek ons belangrijk, gezien de rol van het GAD en van het GABA in het hersenmetabolisme.

Tenslotte hebben wij onze aandacht gericht op de remming welke bij van pyridoxalphosphaat afhankelijke enzymreacties door toevoeging van hydrazides optreedt.

Uit literatuurgegevens bleek dat synthetisch bereide pyridoxalphosphaathydrazonen enige enzymatische decarboxyleringen en transamineringen even sterk activeerden als pyridoxalphosphaat en dit bracht ons er toe de werking van deze hydrazonen bij het GAD na te gaan en te trachten met aanvullende experimenten dit verschijnsel te verklaren.

De indeling van dit proefschrift wordt hiermede als volgt:

Na een algemene inleiding wordt in hoofdstuk II een overzicht gegeven van de rol van het GAD en van het GABA in het hersenmetabolisme, waarbij wij hebben getracht uit de grote hoeveelheid gegevens een kort overzicht samen te stellen.

In hoofdstuk III zijn allereerst de literatuurgegevens betreffende de zuivering van het GAD samengevat, waarna wij een aantal proeven beschrijven, welke tot doel hadden een reproduceerbare meettechniek voor het GAD te vinden. Dit hoofdstuk wordt besloten met de beschrijving van de experimenten, welke wij verricht hebben om tot een zuivering van het GAD te geraken.

Hoofdstuk IV houdt zich bezig met een onderzoek naar de localisatie van het GAD in de cel, terwijl in hoofdstuk V de interactie van een aantal verbindingen met het GAD is beschreven.

De experimenten, waarbij de werking van hydrazonen van pyridoxalphosphaat op het GAD onderzocht is, zijn beschreven in hoofdstuk VI, waarna hoofdstuk VII besluit met conclusies en samenvatting.

II LITERATUUROVERZICHT

1. Inleiding.

Hoewel in dit proefschrift uitsluitend de eigenschappen en de zuivering van het GAD uit hersenen van zoogdieren ter sprake zullen komen, leek het ons nuttig in dit hoofdstuk een korte samenvatting te geven van de rol van dit enzymsysteem en van het GABA in het hersenmetabolisme, waarbij het niet onze bedoeling is de uit de literatuur bekende gegevens uitputtend te behandelen.

De belangrijke rol welke het GABA waarschijnlijk in het zenuwstelsel speelt, was de aanleiding tot het organiseren van een Internationaal Symposium, gehouden in het City of Hope Medical Center (Duarte, Californië) in 1959. Het verslag van deze samenkomst van physiologen, pharmacologen en biochemici (1) geeft een goed beeld van de omvang van de onderzoekingen op dit gebied.

2. Concentratie van vrije aminozuren in de hersenen.

In de meeste gevallen is de concentratie der aminozuren in hersenen en plasma gelijk (2), doch glutaminezuur, GABA, asparaginezuur en glutamine hebben in de hersenen een veel hogere concentratie dan in het plasma. Deze 4 stoffen vormen samen 75% van de totale hoeveelheid vrije aminozuren in kattenhersenen (3), terwijl het in de meeste andere weefsels minder dan de helft van het totaal bedraagt. Deze verdeling geldt eveneens voor hersenen van ratten, muizen, schapen en mensen (4, 5).

Het voorkomen van GABA is echter niet beperkt tot de hersenen, maar kon ook worden aangetoond in bloed en urine (6, 7), oogweefsel (8) (retina en chorea) en in speeksel (9).

In het hersenweefsel heeft het glutaminezuur een concentratie van 9 - 10 μM/g, glutamine 4 - 5 μM/g, GABA 4 - 6.5 μM/g en asparaginezuur 2 - 3 μM/g weefsel. Van glutaminezuur en GABA wordt aangenomen dat zij, in tegenstelling tot glutamine, bij volwassen dieren de bloed-hersenbarrière niet kunnen passeren

(4, 10), doch er is een snelle uitwisseling gevonden tussen ingespoten radioactief gemerkt glutaminezuur uit de bloedbaan en deze zelfde ongemerkte stof uit de hersenen zonder een netto opname der hersenen (11).

ELLIOTT en VAN GELDER (12) vonden dat weefselcoupes uit hersencortex, in tegenstelling tot die uit lever of nier, een duidelijke toename in GABA-concentratie vertoonden bij incubatie in een glucose en GABA bevattend medium. Bij anaerobe incubatie trad echter geen toename van GABA op.

3. Vorming van GABA.

Het GABA werd voor het eerst als een der meest voorkomende aminozuren van zoogdierhersenen door AWAPARA (13) en ROBERTS (14, 15) aangetoond, waarbij zij vaststelden dat intraperitoneale injectie van GABA de concentratie van deze stof in de hersenen niet verhoogde. Daar GABA in dit weefsel wordt aangetroffen, doch niet in staat is de bloed-hersenbarrière te passeren, moet het hier worden gevormd.

UDENFRIEND (16) was in staat door papierchromatografisch onderzoek met gemerkte GABA-derivaten een absoluut bewijs te leveren, dat GABA in de door ROBERTS gebruikte hersenextracten voorkwam.

WINGO en AWAPARA (17) vonden in rattenhersenen een GAD, dat de omzetting van L-glutaminezuur tot GABA katalyseert. Hetzelfde enzym werd door ROBERTS (18) zowel in homogenaten als in acetonpoeders van rattenhersenen aangetoond. Later bleek dat pyridoxalphosphaat als coenzym werkzaam is (19). Evenals andere met dit coenzym functionerende enzymen, wordt het GAD sterk geremd door hydrazides en door hydroxylamine (17, 18, 19).

De enzymatische decarboxylering van glutaminezuur kon bij zoogdieren slechts in het zenuwweefsel worden aangetoond en wel voornamelijk in de grijze massa (15, 20). De enzymatische activiteit neemt in muizen- (15) en in kuikenhersenen (21) met de leeftijd toe totdat de hersenen geheel ontwikkeld zijn, waarbij de activiteitstoename parallel verloopt met de oppervlaktetoename der dendrieten (22). In hoeverre hier sprake is van een coïncidentie of dat er een causaal verband bestaat tussen beide toenamen is nog een open vraag. Micro-analytische methoden maakten het mogelijk de GAD-activiteit in verschillende hersenregionen te bepalen (23, 24).

TOWER (25) en TSUKADA (26) hebben de vorming van GABA in vivo onderzocht en vonden dat de directe voorloper van deze stof het glutaminezuur is, dat op zijn beurt wordt gevormd bij het glucosemetabolisme in de hersenen. ROBERTS (27) heeft ontdekt dat een intracerebrale injectie van radioactief glutaminezuur bij muizen snel wordt gevolgd door een optreden van radioactiviteit in het GABA.

GAD kon ook bij bacteriën (28, 29, 30, 31) en in planten (32, 33, 34, 35, 36, 37) worden aangetoond. WARBURG (38, 39, 40) claimt een reversibele decarboxylering van glutaminezuur bij planten te hebben gevonden gedurende de photosynthese.

4. Metabolisme van GABA.

De enzymatische afbraak van GABA werd in 1953 beschreven door BESSMAN (41) en ROBERTS (42), die ontdekten dat deze stof in ratten- of muizenhersenen getransamineerd wordt. Deze zelfde transaminasereactie is ook gevonden in rattenlever (43) en in microorganismen (44, 45). Pyridoxalphosphaat treedt ook bij deze enzymatische reactie als coenzym op.

Het transaminase uit hersenweefsel is gedeeltelijk gezuiverd door ROBERTS (46, 47), die een stimulering van de activiteit van dit gezuiverd enzym door pyridoxalphosphaat waarnam. Het gedeeltelijk gezuiverd enzympreparaat wordt sterk geremd door hydroxylamine, doch niet door de GAD remmende hoeveelheden semicarbazide (47, 17).

SALVADOR en ALBERS (48) gaven een overzicht van de GABA-transaminase-activiteit in de verschillende delen van apenhersenen, waarbij kwam vast te staan dat de activiteit grotendeels beperkt is tot de grijze massa.

Het bij de transaminering gevormde barnsteenzuursemialdehyde kan in hersenweefsel verder worden omgezet, allereerst door oxydatie tot barnsteenzuur en verder via de citroenzuurcyclus.

ALBERS (49, 50) isoleerde een oplosbaar dehydrogenase uit apenhersenen, dat de omzetting van barnsteenzuursemialdehyde tot barnsteenzuur katalyseert, terwijl JAKOBY (51) en NIRENBERG (52) dit enzym uit *Pseudomonas fluorescens* verkregen.

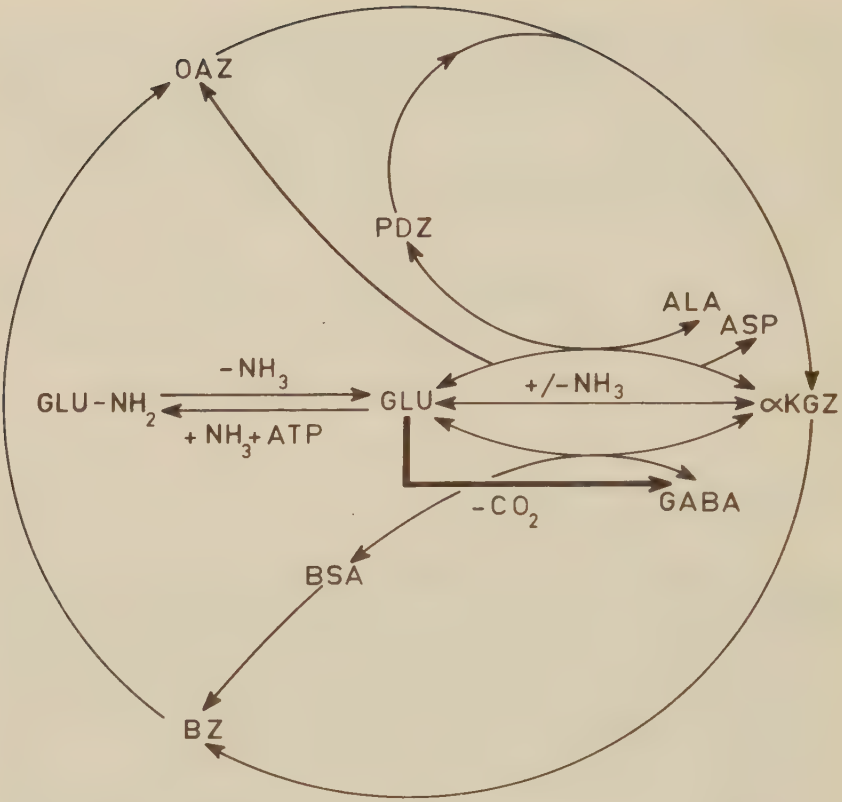

Fig. 1. Metabolisme van glutaminezuur in hersenweefsel. ALA = alanine, ASP = asparaginezuur, BSA = barnsteenzuursemialdehyde, BZ = barnsteenzuur, GLU = glutaminezuur, GLU-NH_2 = glutamine, αKGZ = α-ketoglutaarzuur, OAZ = oxaalazijnzuur, PDZ = pyrodruivenzuur.

TOWER en McKHANN (53) vermeldden dat GABA, glutaminezuur en barnsteenzuursemialdehyde als substraat kunnen dienen voor de oxydatieve phosphorylering van coupes uit kattenhersenen.

De P/O-verhoudingen waren gelijk aan die welke verkregen zijn bij het gebruik van glucose als substraat.

TSUKADA (26) zag een snelle vorming van radioactief CO_2 bij aerobe incubatie van hersencoupes met GABA-^{14}COOH, terwijl deze stof eveneens een toename aan zuurstofopname van het hersenweefsel bewerkte (26, 54).

Het metabolisme van GABA in andere zoogdierweefsels verloopt naar het schijnt op dezelfde wijze. ROBERTS (27) en TSUKADA (26) zagen na intraperitoneale injectie van radioactief gemerkt GABA een snelle incorporatie van radioactiviteit in het barnsteenzuur.

WILSON (55) volgde de afbraak van radioactief GABA na intraperitoneale injectie van deze stof en concludeerde uit de door hem verkregen resultaten dat het GABA via barnsteenzuur en de citroenzuurcyclus afgebroken wordt.

De omzetting van GABA tot verschillende derivaten hiervan is ten dele bekend; zo heeft men een omzetting tot γ-amino-β-hydroxyboterzuur in hersenweefsel vermeld (56), hoewel deze omzetting door anderen wordt betwijfeld. (57).

In nieren en hersenen is eveneens een enzym aangetoond dat de transamidinering tussen GABA en arginine katalyseert, waarbij het γ-guanidinoboterzuur ontstaat (58, 59), welke verbinding uit deze organen geïsoleerd kon worden (60, 61).

KURIAKI (62) en KEWITZ (63) toonden in hersenweefsel het γ-aminobutyrylcholine aan, terwijl het onlangs PISANO gelukte uit runderhersenen het γ-aminobutyrylhistidine (homocarnosine) te isoleren (64).

Het is duidelijk dat het voorkomen van GAD, GABA-transaminase en barnsteenzuursemialdehyde-dehydrogenase in hersenweefsel de omzetting van α-ketoglutaarzuur tot barnsteenzuur mogelijk maakt buiten de citroenzuurcyclus om (zie fig. I). McKHANN en medewerkers (65) hebben uit experimentele gegevens berekend dat onder normale omstandigheden in de hersenen ongeveer 44% van het α-ketoglutaarzuur via deze GABA-shunt wordt omgezet.

5. De rol van GABA en hiervan afgeleide derivaten in zenuwweefsel.

Er zijn redenen te veronderstellen dat, wanneer het oxydatieve metabolisme in de hersenen hapert wegens een tekort aan substraat in de vorm van glucose, het glutaminezuur en het GABA helpen dit metabolisme op gang te houden.

Gedurende een door insuline veroorzaakte hypoglycaemie was de concentratie van het glutaminezuur en van het GABA verlaagd,

die van asparaginezuur daarentegen verhoogd (66, 67). ELLIOTT (68) vermeldt dat na insulinebehandeling een hoger percentage van de totale hoeveelheid GABA in de hersenen in de extracellulaire vloeistof wordt teruggevonden, mogelijk veroorzaakt door een verminderde hoeveelheid glucose in de hersenen. Hij oppert de veronderstelling dat deze resultaten misschien verklaard zouden kunnen worden uit de ervaringen van ELLIOTT en VAN GELDER (12) dat glucose noodzakelijk is voor een netto opname van GABA door het hersenweefsel.

Het feit dat intraveneus ingespoten glutaminezuur het hypoglycaemisch coma kan verlichten (69), wijst ook in deze richting.

KILLAM en BAIN (70) zagen dat het gehalte der hersenen aan GABA vermindert bij een door semicarbazide veroorzaakte convulsie en zij veronderstelden, dat te lage concentraties van deze stof altijd gepaard gaan met aanvallen (71). Dit stemt overeen met de gegevens van ROBERTS (27) dat thiosemicarbazide-injecties zouden resulteren in een verminderde vorming van GABA uit glutaminezuur in vivo.

Convulsies, veroorzaakt door fluoroacetaat (66) of door strychnine (72) gaan gepaard met een verlaging van de glutaminezuurconcentratie in de hersenen.

Het vermoeden dat GABA een remmende of regulerende rol bij de neuronale activiteit zou spelen, werd geuit nadat men de werking van deze stof op talrijke zenuwweefselpreparaten had onderzocht (10).

In 1953 ontdekte FLOREY (73, 74) dat een extract uit runderhersenen, welke een organische stikstofverbinding bevatte, een remmende werking vertoonde op een sensibel neuron van de strekreceptor der crustaceae. De werkzame stof van dit extract, later Factor I (Inhibition) genoemd, werd gezuiverd door BAZEMORE, ELLIOTT en FLOREY (75, 76) en deze onderzoekers beweerden dat het identiek was met GABA.

McLENNAN (77) kon geen vrij GABA aantonen in een gedeeltelijk gezuiverd preparaat en opperde de veronderstelling dat er tijdens de zuivering een afbraak was opgetreden van een natuurlijk product dat GABA bevatte.

De gevoeligheid van de strek-receptor voor Factor I heeft voor de groep van ELLIOTT de basis gevormd van de quantitatieve GABA bepalingen.

De bepalingen van het GABA in verschillende weefsels, volgens deze methoden verricht (12, 78), komen over het algemeen goed

overeen met de enzymatische of fluorometrische bepalingen (67, 79). De Factor I methode ter bepaling van GABA is echter niet geheel betrouwbaar, daar een aantal derivaten van GABA, welke normaal in de hersenen aanwezig zijn, in het bijzonder γ-amino-β-hydroxyboterzuur (76, 80) een Factor I activiteit vertonen.

Daar het GABA de bloed-hersenbarrière niet kan passeren, vertoont het geen effect op het centrale zenuwstelsel na intraperitoneale injectie, tenzij deze barrière gedeeltelijk is beschadigd (81).

Plaatselijk in de hersenen ingebracht veroorzaakt GABA een blokkade bij prikkeloverdragende synapsen, maar dit is slechts beperkt tot de plaats van inbrenging (82, 83).

De werkelijke aard der remming van het GABA is een onderwerp van veel onderzoekingen geweest en dit probleem is zeker nog niet volledig opgelost. Deze remmende werking zou kunnen berusten op een activering van dempende systemen of op een remming van synaptische transmissie, waarbij het laatste het meest waarschijnlijk is.

PURPURA en medewerkers (84) onderzochten de werking van verschillende ω-aminozuren op de corticale synaptische activiteit, terwijl EDWARDS (85) de invloed van deze verbindingen op de strek-receptor der crustaceae naging. De werking van deze stoffen bleek echter sterk af te hangen van het onderzochte zenuwweefselpreparaat.

KUFFLER en EDWARDS (86) meenden dat GABA zenuwimpulsen blokkeert door selectief de passage van bepaalde ionen door de zenuwcelmembraan te bevorderen. Deze vermeerdering van ionengeleiding zou processen kunnen beïnvloeden welke aanleiding zijn tot het ontstaan van geleide zenuwimpulsen.

GRUNDFEST en medewerkers (87, 88, 89) veronderstelden daarentegen dat GABA de prikkeloverdracht van de synapsen in de hersenen blokkeert.

HAYASHI (90, 91) meent bewezen te hebben dat GABA de voorloper is van een convulsivum, daar in het ruggemerg toegediende injecties, welke ATP, GABA, vitamine B_{12} en een door oxydatie energie leverende verbinding bevatten bij katten hevige krampen veroorzaakten. Daar uit experimenten was gebleken dat het γ-aminobutyrobetaine een krachtig convulsivum is (92), opperde HAYASHI de veronderstelling dat de vorming in vivo van een gemethyleerd derivaat van GABA verantwoordelijk was voor het optreden van convulsies.

Ongetwijfeld treden deze convulsieve reacties slechts op bij een overmaat van deze verbindingen, terwijl zij onder physiologische omstandigheden een normaal centraal exciterende werking vertonen.

PURPURA (88) vond dat het γ-guanidinoboterzuur zwak antagonistisch werkte bij de GABA effecten op zenuwweefsel van zoogdieren, terwijl KUFFLER en EDWARDS een effect zagen, weliswaar zwakker, maar gelijk gericht als GABA bij de crustaceae receptor.

Het γ-aminobutyrylcholine bleek eveneens als remstof voor neuronale activiteit werkzaam te zijn (93, 94).

6. De GABA-concentratie in de hersenen.

Het GABA-gehalte der hersenen hangt af van de vormingssnelheid van deze stof uit glutaminezuur en van de snelheid van transaminering, gevolgd door oxydatie. Daar BESSMAN (41) vond dat de transaminering tot barnsteenzuursemialdehyde reversibel verloopt, is de snelheid van de enzymatische oxydatie van dit semialdehyde tot barnsteenzuur een belangrijke factor.

Het bleek dat in bijna alle onderzochte delen der hersenen het GABA-transaminase het GAD in activiteit overtrof (24,48).

ALBERS en BRADY (24) concludeerden hieruit dat onder normale omstandigheden de glutaminezuurdecarboxylering de snelheid bepalende stap is. Een samenhang tussen de functie van bepaalde delen der hersenen en de activiteit van deze enzymen zal nog met andere, gevoeliger, methoden onderzocht moeten worden. ROBERTS (27) vermeldde dat het pH optimum voor het GAD 6.5 is, terwijl het optimum voor het GABA-transaminase 8.2 bedraagt. Het is dus te verwachten dat een weefselacidose de GABA-concentratie zal verhogen, terwijl een alkalose deze zal verlagen.

Wanneer ratten verblijven in een ruimte met abnormaal hoge CO_2-concentratie, ontstaat er een spier- en hersenacidose, terwijl het GABA-gehalte in de hersenen stijgt, gepaard gaande met verminderde hersenprikkelbaarheid (95).

Vitamine B_6 (Pyridoxine) speelt een zeer belangrijke rol bij het metabolisme van het glutaminezuur in de hersenen. Het GAD is zeer gevoelig voor pyridoxinedeficiëntie, daar het coenzym

gemakkelijk dissocieert van het apoenzym (47, 96), in tegenstelling tot het GABA-transaminase, waarbij het coenzym steviger aan het apoenzym gebonden is.

Het GAD werkt in vivo in de hersenen met een sub-optimale snelheid, daar de normale vitamine B_6 concentratie in de hersenen laag is. Pyridoxine-injecties stimuleerden de decarboxylase-activiteit bij ratten slechts weinig (97), maar wanneer aan hersenhomogenaten pyridoxalphosphaat wordt toegevoegd, treedt er een sterke activering op (18, 19).

TURSKY (98) meent dat de decarboxylering van glutaminezuur voornamelijk wordt bepaald door de pyridoxalphosphaat-concentratie in de hersenen. Een duidelijke stijging van de decarboxylase-activiteit in de hersenen trad op na stimulering van ratten door caffeine of electroshock, terwijl er tevens een verhoogd vitamine B_6 gehalte werd gevonden.

Misschien kan aldus het feit verklaard worden, dat het glutaminezuurgehalte van rattenhersenen na zware inspanning (99, 100) vermindert door het beschikbaar komen van vitamine B_6 voor de decarboxylasewerking.

Een vitamine B_6-deficiëntie, veroorzaakt door een dieet of door vitamine B_6-antagonisten, kan een zeer gecompliceerde metabolische ontwrichting met verreikende consequenties voor de verschillende functies van het zenuwstelsel met zich brengen.

Klinisch bleek, dat vitamine B_6-deficiëntie (71, 101, 102) kan leiden tot convulsies, welke verlicht kunnen worden door pyridoxine injecties.

BAXTER en ROBERTS (103) slaagden er in met intraperitoneale inspuitingen van niet lethale doses hydroxylamine het GABA-gehalte duidelijk te verhogen. Het hydroxylamine geeft in vivo geen sterke remming van het GAD, doch doet dit wel bij het transaminase, terwijl in vitro beide geremd worden.

Uit dit overzicht moge blijken, dat de directe samenhang tussen het GABA-niveau en de mate van prikkelbaarheid van de hersenen nog geenszins is bewezen. Doch kennelijk zijn er aanwijzingen dat verdere physiologische en biochemische onderzoekingen op dit gebied tot een oplossing zullen voeren.

LITERATUUR

1. Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960.
2. H. Waelsch — Metabolism of the nervous system Ed. D. Richter. Pergamon Press, London, 1957 p. 431.
3. H.H. Tallan, S. Moore, S. Stein — J.Biol. Chem. 211, 927 (1954).
4. P. Schwerin, S.P. Bessman, H. Waelsch — J.Biol. Chem. 184, 37 (1950)
5. E. Roberts — Progress in Neurobiology 1, 11 (1956).
6. C.E. Dent — Biochem.J. 43, 169 (1948).
7. A.H. Gordon — Biochem.J. 45, 99 (1949).
8. K. Kojima, K. Mizuno, M. Miyazaki — Nature 181, 1200 (1958).
9. L. Capozzi — Chem.Abstracts 48, 13892 d (1954).
10. K.F. Killam — Fed.Proc. 17, 1018 (1958).
11. A.Lajtha, S.Berl, H.Waelsch — J.Neurochem. 3, 322 (1959).
12. K.A.C. Elliott, N. M. van Gelder — J.Neurochem. 3, 28 (1958).
13. J. Awapara, A.J. Landua, R. Fuerst, B. Seale — J.Biol.Chem. 187, 35 (1950).
14. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 187, 55 (1950).
15. E. Roberts, S. Frankel, P.J. Harman — Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 78, 383 (1950).
16. S. Udenfriend — J.Biol.Chem. 187, 65 (1950).
17. W.J. Wingo, J. Awapara — J.Biol.Chem. 187, 267 (1950).
18. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 188, 789 (1950).
19. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 190, 505 (1951).
20. D. Holtz, E. Westermann — Arch.Exp.Pathol.Pharmakol. 231, 311 (1957).
21. B. Sisken, E. Roberts, C.F. Baxter — Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960 p. 219.
22. C.F. Baxter, J.P. Schadé, E. Roberts — Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960 p.214.

23. I. P. Lowe, E. Robins, S. Eyerman — J. Neurochem. 3, 8 (1958).
24. R. W. Albers, R. O. Brady — J. Biol. Chem. 234, 926 (1959).
25. D. B. Tower — Biochemistry of the Central Nervous System, IV Intern. Congr. of Biochem. (Ed. F. Brücke), Pergamon Press, London, 1959, p. 213.
26. Y. Tsukada, Y. Nagata, G. Takagaki — Proc. Japan Acad. 33, 510 (1957).
27. E. Roberts, M. Rothstein, C. F. Baxter — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 796 (1958).
28. E. F. Gale — Adv. Enzymol. 6, 1 (1946).
29. E. Work — Biochim. Biophys. Acta 3, 400 (1949).
30. I. Gunsalus — Fed. Proc. 9, 556 (1950).
31. R. Shukaya, G.W. Schwert — J. Biol. Chem. 235, 1649, 1653, 1658 (1960).
32. H. Beevers — Biochem. J. 48, 132 (1951).
33. F.C. Steward, J.F. Thompson, C.E. Dent — Science 110, 439 (1949).
34. A.C. Hulme, W. Arthington — Nature 165, 716 (1950).
35. R.G. Westall — Nature 165, 717 (1950).
36. L.J. Reed — J. Biol. Chem. 183, 451 (1950).
37. O. Schales, V. Mims, S.S. Schales — Arch. Biochem. Biophys. 10, 455 (1946).
38. O. Warburg, H. Klotzsch, G. Krippahl — Z. Naturforsch. 12 b, 622 (1957).
39. O. Warburg, H. Klotzsch, G. Krippahl — Naturwissenschaften 44, 235 (1957).
40. O. Warburg — Science 128, 68 (1958).
41. S.P. Bessman, J. Rossen, E.C. Layne — J. Biol. Chem. 201, 385 (1953).
42. E. Roberts, H.N. Bregoff — J. Biol. Chem. 201, 393 (1953).
43. E. Roberts — Arch. Biochem. Biophys. 48, 395 (1954).
44. E. Roberts, P. Ayengar, I. Posner — J. Biol. Chem. 203, 195 (1953).
45. E.M. Scott, W.B. Jakoby — J. Biol. Chem. 234, 932 (1959).
46. C.F. Baxter, E. Roberts — J. Biol. Chem. 233, 1135 (1958).
47. E. Roberts, C.F. Baxter — Neurol. 8 suppl. 1, 77 (1958).

48. R.A. Salvador, R.W. Albers — J.Biol.Chem. 234, 922 (1959).
49. R.W. Albers, R.A. Salvador — Science 128, 359 (1958).
50. R.W. Albers, G.J. Koval — Biochim.Biophys.Acta 52, 29 (1961).
51. W.B. Jakoby, E.M. Scott — J.Biol.Chem. 234, 937 (1959).
52. M.W. Nirenberg, W.B. Jakoby — J.Biol.Chem. 235, 954 (1960).
53. D.B. Tower, G.M. McKhann — Am.J.Physiol. 196, 36 (1959).
54. S. Sumida — Chem.Abstracts 52, 18741i (1958).
55. W.E. Wilson, R.J. Hill, R.E. Koeppe — J.Biol.Chem. 234, 347 (1959).
56. K.Ohara, I.Sano, H.Koizuma, K. Nishinuma — Science 129, 1225 (1959).
57. C. Mitoma — Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960 p. 236.
58. J.J. Pisano, C.Mitoma, S.Udenfriend — Nature 180, 1125 (1957).
59. J.J. Pisano, S.Udenfriend — Fed.Proc. 17, 403 (1958).
60. F.Irreverre, R.L.Evans, A.R. Hayden, R. Silber — Nature 180, 704 (1957).
61. F.Irreverre, R.L.Evans — J.Biol.Chem. 234, 1438 (1959).
62. K.Kuriaki, T.Yakushiji, T.Noro, T.Shimizu, S.Saji — Nature 181, 1336 (1958).
63. H. Kewitz — Naturwissenschaften 46, 495 (1959).
64. J.J. Pisano, J.D. Wilson, L. Cohen, D. Abraham, S. Udenfriend — J.Biol.Chem. 236, 499 (1961).
65. G.M. McKhann, R.W. Albers, L.Sokoloff, O.Mickelsen, D.B. Tower — Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960 p. 169.
66. R.M.C. Dawson — Biochim.Biophys.Acta 11, 548 (1953).
67. R.O. Cravioto, G.Massieu, J.J. Izquierido — Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 78, 856 (1951).
68. K.A.C.Elliott, H.H.Jasper — Physiol.Rev. 39, 397 (1959).

69. W.Mayer-Gross, J.W. Walker — Biochem.J. 44, 92 (1949).
70. K.F. Killam, J.A. Bain — J.Pharmacol.Exptl.Therap. 119, 255 (1957).
71. K.F. Killam — J.Pharmacol.Exptl.Therap. 119 263 (1957).
72. C.Haber, L.Saidel — Fed.Proc. 7, 47 (1948).
73. E. Florey — Naturwissenschaften 40, 413 (1953).
74. E. Florey — Arch.Intern.Physiol. 62, 33 (1954).
75. A. Bazemore, K.A.C.Elliott, E. Florey — Nature 178, 1052 (1956).
76. A.Bazemore, K.A.C.Elliott, E. Florey — J.Neurochem. 1, 334 (1957).
77. H. McLennan — Nature 181, 1807 (1958).
78. N.M. van Gelder, K.A.C. Elliott — J.Neurochem. 3, 139 (1958).
79. S. Berl, H. Waelsch — J.Neurochem, 3, 161 (1958).
80. H. McLennan — J.Physiol. 139, 79 (1957).
81. D.P. Purpura, M.Girado, T.G. Smith, J.A. Gomez — Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 97, 348 (1958).
82. D.P. Purpura, M.Girado, H. Grundfest — Science 125, 1200 (1957).
83. K.Iwama, H.H.Jasper — J.Physiol. 138, 365 (1957).
84. D.P. Purpura — Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960 p. 495.
85. C. Edwards — Inhibition in the nervous system and gamma-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960 p. 386.
86. S.W. Kuffler, C. Edwards — J.Neurophysiol. 21, 589 (1958).
87. D.P. Purpura, M.Girado, H.Grundfest — Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 95, 791 (1957).
88. D.P. Purpura, M.Girado, H.Grundfest — Science 127, 1179 (1958).
89. H.Grundfest — Physiol.Rev. 37, 337 (1957).
90. T.Hayashi — Nature 182, 1076 (1958).

91.	T. Hayashi	Inhibition in the nervous system and gamma. aminobutyric acid. Pergamon Press, London 1960 p. 238.
92.	E. Hosein	Nature 183, 328 (1959).
93.	H. Takahashi, A. Nagashima, C. Koshino	Nature 182, 1443 (1958).
94.	M. Asano, T. Noro, K. Kuriaki	Nature 185, 848 (1960).
95.	D. M. Woodbury, A. Verdankis	Fed. Proc. 17, 420 (1958).
96.	E. Roberts, F. Younger, S. Frankel	J. Biol. Chem. 191, 277 (1951).
97.	C. de Marco	Biochim. Biophys. Acta 25, 634 (1957).
98.	T. Tursky, J. Sedlak	Chem. Abstracts 52, 20692 b (1958).
99.	R. Vrba	Nature 176, 1258 (1955).
100.	R. Vrba	J. Neurochem. 1, 12 (1956).
101.	J. Chick, M. M. El Sadr. A. N. Worden	Biochem. J. 34, 205 (1940).
102.	R. A. Patton, H. W. Karn, H. E. Longenecker	J. Biol. Chem. 152, 181 (1944).
103.	C. F. Baxter, E. Roberts	J. Biol. Chem. 236, 3287 (1961).

III ISOLERING EN ONDERZOEK NAAR ZUIVERING VAN HET GAD UIT HERSENWEEFSEL

1. Literatuuroverzicht.

Alvorens over te gaan tot het bespreken van de resultaten van onze onderzoekingen aan het GAD uit hersenweefsel van ratten en muizen, zullen wij eerst een overzicht geven van de uit de literatuur bekende gegevens omtrent de enzymzuivering. Wij zullen hierbij tevens een korte samenvatting geven van de onderzoekingen welke men verricht heeft aan het GAD uit plantaardig weefsel, hoewel dit enzym in verschillende opzichten afwijkt van het GAD uit dierlijk weefsel. Hierbij beperken wij ons tot de publicaties waarin een zuivering van het enzym vermeld is.

1.1 GAD uit plantaardig weefsel.

Uit literatuurgegevens over het voorkomen en de zuivering van het GAD in plantaardig materiaal blijkt, dat men met de zuivering van het enzym uit deze weefsels veel verder is gevorderd dan met het hersenenzym het geval is. Een belangrijke reden voor deze voorsprong ligt misschien in het feit, dat het GAD bij planten en bacteriën in ruwe homogenaten een aanzienlijk hogere activiteit per gewichtseenheid weefsel vertoont dan het overeenkomstige enzym uit dierlijk weefsel.

De stevige binding welke er bij het GAD uit plantaardig materiaal tussen coenzym en apoenzym bestaat, heeft ongetwijfeld een belangrijke factor gevormd bij de verkregen zuivering.

De meest uitgebreide onderzoekingen aan het GAD uit bacteriën werden verricht door SHUKUYA en SCHWERT (1). Zij vonden dat het GAD, geïsoleerd uit *E. coli*, optimaal werkt bij pH 3.8 terwijl het moleculairgewicht, bepaald uit sedimentatiesnelheid en diffusiemetingen, voor dit ongeveer voor 90% zuivere preparaat op 300.000 werd geschat. De Michaelis constante bij pH 4.6 in een pyridine-pyridine HCl buffer was 8.2×10^{-4}M. Pyridoxalphosphaat toevoeging deed de activiteit van het enzym 25% stijgen en deze bedroeg na zuivering, onder optimale omstandigheden, 17000 μl CO_2/10 min/mg eiwit. Eerdere onderzoekingen, verricht door GALE (2), NAJJAR (3) en ROBERTS (4), gaven voor het pH optimum en de Michaelis constante ongeveer gelijke waarden. ANDERSON (5) slaagde er in het GAD uit moederkoren

(*Claviceps purpurea*) gedeeltelijk te zuiveren. De specifieke activiteit van het gezuiverde preparaat bedroeg 111 μl CO_2/10 min/mg eiwit, hetgeen een 77-voudige zuivering betekende, terwijl deze zonder toevoeging van pyridoxalphosphaat slechts 5% hiervan bedroeg.

Tenslotte wijzen wij nog op de onderzoekingen van BEEVERS (6), die met een enzym werkte geïsoleerd uit gerstenwortels, van SMITH en WAYGOOD (7), werkend met een enzym uit zonnebloemcotyledonen en van BÖTTGER (8), die het GAD uit suikerbieten onderzocht.

1.2 GAD uit dierlijk weefsel.

Een der eerste publicaties over het GAD uit hersenweefsel is afkomstig van WINGO en AWAPARA (9). Zij werkten met ruwe homogenaten van rattenhersenen en waren in staat de Michaelis constante voor dit enzym te bepalen. Deze bedroeg 2.1 x 10^{-2}M, terwijl het pH optimum bij 6.8 lag. Zij vermeldden dat cyanide, hydroxylamine en semicarbazide een remmende werking op het enzym uitoefenden, terwijl asparaginezuur competitief bleek te remmen. Zij voegden bij hun metingen geen extra pyridoxalphosphaat toe.

Gelijktijdig verscheen er een serie publicaties van ROBERTS en FRANKEL (10, 11, 12). Zij werkten met muizenhersenen en hun ervaringen stemmen goed overeen met die van WINGO en AWAPARA. Als eersten voegden zij het coenzym pyridoxalphosphaat toe en constateerden direct een verhoging van de activiteit van het enzym. Als pH optimum werd 6.4 – 6.5 gevonden en de Michaelis constante bleek hier 6.4 x 10^{-3}M te bedragen. Het enzym bleek zeer specifiek te zijn voor L-glutaminezuur en geremd te worden door een groot aantal verbindingen zoals: histidine, lysine, arginine, ornithine, carbamyl-L-glutaminezuur en cysteine. Pyridoxalphosphaat bleek als coenzym niet te kunnen worden vervangen door pyridoxal, pyridoxine, 4-desoxypyridoxine, 4-methoxymethylpyridoxine of pyridoxamine.

Bij toevoeging van pyridoxal en ATP aan het homogenaat in aanwezigheid van fluoride, werd een stimulering van de activiteit gezien, hetgeen ongetwijfeld te danken was aan het gevormde pyridoxalphosphaat. Een poging tot zuivering van het enzym werd niet met succes bekroond.

De activiteit van een homogenaat uit muizenhersenen bedroeg bij deze onderzoekers onder optimale omstandigheden 350 μl CO_2/u/500 mg weefsel, terwijl rattenhersenen een activiteit vertoonden welke ongeveer 80% hiervan bedroeg. Hersenen van ratten welke gevoed waren met een pyridoxine-deficient dieet, vertoonden zonder toevoegen

van extra pyridoxalphosphaat een verminderde endogene GAD-activiteit, doch het bleek dat de hoeveelheid apoenzym normaal was.

DAVISON (13) deed een onderzoek naar de enzymatische decarboxylering van cysteinesulfonzuur, cysteinezuur en glutaminezuur in lever en hersenen. Het bleek dat de decarboxylering van glutaminezuur slechts plaats vond in de hersenen, terwijl de beide andere zuren in beide weefsels gedecarboxyleerd werden. Uit het ontbreken van een sommering van activiteiten bij incubatie van verschillende combinaties van deze zuren met een enzymatisch actief hersenextract, concludeerde DAVISON, dat hij hier met hetzelfde enzym te maken had. Een gelijke verdeling van activiteit voor de 3 substraten over het sediment en het supernatant bij centrifugatie van een homogenaat en een gelijke mate van inactivering van het homogenaat bij verwarming, wijzen eveneens in deze richting. Hij neemt echter aan dat het uit de lever geïsoleerde enzym verschilt van het enzym uit de hersenen.

In een voorlopige mededeling vermeldden STEENSHOLT en JONER (14) dat zij bij het GAD uit hersenen een activering vonden bij toevoeging van Mn^{++} ionen en dat zij er in geslaagd waren het enzym enigermate te zuiveren. Gegevens hierover zijn echter noch in deze, noch in een uitvoeriger publicatie vermeld.

Tenslotte willen wij in deze inleiding nog HADO (15) vermelden, die, werkend met een extract uit acetonpoeder van muizenhersenen, bij toevoeging van pyridoxalphosphaat een K_m voor het GAD van 6.3×10^{-3}M vond.

2. Isolering van het GAD en oriënterende proeven.

2.1 Methodieken.

Bij onze onderzoekingen werd uitgegaan van hersenen van volwassen muizen en ratten. Na decapitatie werden de hersenen geïsoleerd, gewassen in ijskoud aqua dest. en, na met filtreerpapier gedroogd te zijn, gewogen om direct hierna in aqua dest. gehomogeniseerd te worden.

De hoeveelheid vloeistof werd zó gekozen dat een 20% homogenaat ontstond.

Het homogeniseren geschiedde bij 2°C in een homogenisator volgens BÜHLER gedurende 2 min., waarna de aldus verkregen suspensie nogmaals behandeld werd in een homogenisator volgens POTTER-ELVEHJEM gedurende dezelfde tijd. De activiteit van het aldus verkregen homogenaat werd uitgedrukt als μl CO_2/u/500 mg weefsel.

Uit dit homogenaat werd meestal een heldere, enzymatisch-actieve eiwitoplossing bereid door centrifugatie bij 105.000 g gedurende een half uur. Hierbij werd gebruik gemaakt van een Spinco-L centrifuge met rotor 40.

Wanneer wij werkten met een aldus verkregen helder supernatant en zo in staat waren door een spectrophotometrische bepaling het eiwitgehalte te bepalen, drukten wij de activiteit van het preparaat uit in μl CO_2/u/mg eiwit.

Het bepalen van de activiteit van het enzympreparaat berustte op het meten van de hoeveelheid CO_2 welke tijdens de reactie vrij kwam. Deze meting geschiedde volgens de methode van WARBURG waarbij de hoeveelheid gevormd CO_2 bij een vastgestelde temperatuur manometrisch wordt bepaald. Er werd hiervoor gebruik gemaakt van Warburgapparaten (Firma Braun, model V) waarop met maximaal 14 manometers gemeten kon worden, terwijl de temperatuur steeds 37°C bedroeg.

De gebruikte incubatievaatjes, voorzien van 2 zijarmen, waren als volgt gevuld:

Hoofdvat	: 1.0 ml	enzymoplossing
	1.0 ml	0.1 M phosphaatbuffer pH 6.3 volgens SÖRENSEN
	0.1 ml	0.05 M phosphaatbuffer pH 6.3 òf
	0.1 ml	0.1 M -SH-verbinding.
1e zijvat	: 0.3 ml	0.5 M glutaminezuur pH 7.4
	0.1 ml	pyridoxalphosphaatoplossing in water (50 γ bevattend).
2e zijvat	: 0.3 ml	$2N_2H\ SO_4$

De metingen geschiedden steeds anaeroob door vóór de meting gedurende 10 min. stikstof door te leiden, dat eerst door een pyrogallol-NaOH oplossing (15 g pyrogallol in 100 ml 50% NaOH) was gevoerd. Na het stikstof doorleiden werd er gedurende 10 min. geëquilibreerd waarna de meting een aanvang nam. Na 15 min. werd het substraat uit het 1e zijvat gevoegd bij de enzymoplossing in het hoofdvat en na 75 min. werd de reactie gestopt, door de inhoud van het 2e zijvat eveneens aan het incubatiemengsel toe te voegen, waarbij tevens het gebonden CO_2 door het zwavelzuur werd vrijgemaakt. De metingen geschiedden steeds in duplo, terwijl een derde vat, waaraan gelijktijdig met het substraat het zwavelzuur werd toegevoegd, dienst deed als temperatuur-barometer correctie en tevens een correctie opleverde voor de hoeveelheid CO_2 welke vóór het toevoegen van het substraat aanwezig was.

De eiwitconcentratie van de heldere ezympreparaten werd bepaald door absorptiemetingen bij 260 mμ en 280 mμ volgens de methode van WARBURG en CHRISTIAN (16). Bij deze metingen werd gebruik gemaakt van een Unicam spectrophotometer SP 500.

2.2 Activiteitsbepaling van homogenaten.

Allereerst hebben wij getracht de experimenten verricht door ROBERTS en FRANKEL (10, 11, 12) te reproduceren. Hiertoe werden enige proeven ingezet, waarbij wij het verband tussen substraatconcentratie en coenzymconcentratie enerzijds en GAD-activiteit anderzijds onderzochten. Tevens gingen wij na in hoeverre de activiteit behouden bleef wanneer wij het enzym langere tijd bij -20° C bewaarden. Tabel 1 geeft een beeld van de activiteit van een muizenhersenhomogenaat in verse toestand en na verschillende dagen bevroren te zijn geweest, waarna het in een waterbad van 37°C werd ontdooid.

Tabel 1
GAD-activiteit van een muizenhersenhomogenaat vóór en na bewaren bij -20°C.

tijd van bewaren	activiteit in μl CO_2/uur/500 mg weefsel	percentage resterende activiteit
-	537	(100)
1 dag	478	89
3 dagen	498	93
7 dagen	510	95
8 dagen	456	85

Uit deze getallen blijkt dat wij met een goed actief preparaat werken, dat, op deze wijze bewaard, zijn activiteit redelijk behoudt.

De activiteiten van muizenhersenhomogenaten lagen over het algemeen in de orde van grootte van 500 μl CO_2/u/500 mg weefsel, terwijl rattenhersenhomogenaten een waarde van ongeveer 450 μl CO_2/u/500 g weefsel opleverden. Daar dit laatste weefsel een goed meetbare activiteit vertoonde en gezien het feit dat het gewicht der hersenen van een volwassen rat ongeveer het vijfvoudige bedraagt van het gewicht van de hersenen van een muis, zijn wij bij onze volgende proeven uitgegaan van rattenhersenen.

Dit betekende voor ons een aanzienlijke tijdwinst bij het isoleren van ons materiaal. Wij hebben eveneens runderhersenen onderzocht op hun GAD-activiteit, doch wij vonden hier een waarde van ongeveer

100 μl CO_2/u/500 mg weefsel. Gezien deze geringe activiteit hebben wij geen verder gebruik gemaakt van dit in grote hoeveelheden verkrijgbaar materiaal.

Homogenaten bereid uit acetonpoeders van hersenen, leverden in eerste instantie een redelijke activiteit op, doch deze daalde snel bij het ouder worden van het poeder. Zeer waarschijnlijk is een oxydatie van het enzym de oorzaak van deze verminderde werking.

Tabel 2 geeft een beeld van de afhankelijkheid van de hoeveelheid ontwikkeld CO_2 bij verschillende incubatietijden. Zoals te verwachten is bleek de CO_2-ontwikkeling recht evenredig te verlopen met de incubatietijd.

Tabel 2
Hoeveelheid vrijgekomen CO_2
bij verschillende incubatietijden van een hersenhomogenaat.

tijd in min.	15	30	45	60	75
μl CO_2/500 mg weefsel	108	235	328	472	570

Bij een hersenhomogenaat hebben wij de invloed van de substraatconcentratie op de hoeveelheid ontwikkeld CO_2 nagegaan en wij hebben deze waarden als percentages van de activiteit, welke wij verkregen bij een 0.06 M eindconcentratie glutaminezuur, in tabel 3 verzameld.

Tabel 3
GAD-activiteit van een hersenhomogenaat
bij verschillende glutaminezuurconcentraties.

eindconcentratie glutaminezuur	0.06 M	0.04 M	0.03 M	0.02 M	0.01 M
percentage activiteit	(100)	96	92	87	71

Met deze gegevens waren wij in staat volgens de methode van LINEWEAVER en BURK.(17) de Michaelis constante voor het GAD in dit homogenaat te berekenen, waarvoor wij een waarde van 5.3×10^{-3} M vonden. Deze komt redelijk overeen met de door ROBERTS en FRANKEL (11) en HADO (15) gevonden waarden. Bij onze berekening is geen rekening gehouden met de reeds in het homogenaat aanwezige hoeveelheid glutaminezuur.

Tenslotte willen wij nog een serie proeven vermelden, waarbij de activiteit werd bepaald bij toevoeging van verschillende hoeveelheden pyridoxalphosphaat. De eindconcentratie glutaminezuur was hier 0.06 M. Deze waarden zijn uitgedrukt als percentages van de activiteit welke wij verkregen bij een 7.5×10^{-5} M eindconcentratie pyridoxalphosphaat (50 γ/vat) en zijn samengevat in tabel 4.

Tabel 4
De GAD-activiteit van een hersenhomogenaat
bij verschillende pyridoxalphosphaatconcentraties.

eindconcentratie pyridoxalphosphaat	percentage activiteit	eindconcentratie pyridoxalphosphaat	percentage activiteit
7.5×10^{-5} M	(100)	3.8×10^{-6} M	71
3.8×10^{-5} M	93	1.5×10^{-6} M	64
1.5×10^{-5} M	93	7.5×10^{-7} M	52
7.5×10^{-6} M	88	-	30

Uit deze gegevens blijkt, dat het enzym zonder toevoeging van extra pyridoxalphosphaat slechts op ongeveer 1/3 van zijn maximale activiteit werkt.

3. Onderzoek naar de werking van -SH verbindingen op het GAD.

3.1 Literatuuroverzicht.

ROBERTS en FRANKEL (11) vermeldden reeds in een van hun eerste publicaties over het GAD uit hersenweefsel, dat cysteine in een eindconcentratie van 0.1 M bij een optimale concentratie glutaminezuur, een remming van 62% gaf. Zeer waarschijnlijk werd bij deze proef geen extra pyridoxalphosphaat toegevoegd. Dit verschijnsel kon door BERGERET en medewerkers (18) worden bevestigd, doch zij vermeldden niet de mate van remming. Tevens bleek dat de enzymatische decarboxylering van cysteinesulfonzuur en cysteinezuur in homogenaten van nier, lever en hersenen door cysteine werd geremd, waarbij de sterkte van de remming afhing van de mate waarin het enzymsysteem afhankelijk was van het pyridoxalphosphaat, hetgeen ook bij de laatstgenoemde enzymen als coenzym optrad. Met 2-3-dimercaptopropanol

(BAL) werden deze resultaten eveneens verkregen, hetgeen kon worden bevestigd door DE MARCO (19), die bij een eindconcentratie van 3×10^{-3} BAL een belangrijke remming van het GAD vaststelde. Volgens BERGERET berust de remming door het cysteine op een wegvangen van het pyridoxalphosphaat onder vorming van het 2-(2'-methyl-3'-hydroxy-5'-hydroxymethyl-4'-pyridyl)-4-thiazolidinecarbonzuur, welke reactie door HEYL (20) is aangetoond, terwijl het BAL een thiohemiacetaal van pyridoxalphosphaat vormt. Men vond een snelle verandering van het spectrum van pyridoxalphosphaat bij toevoeging van cysteine, waarbij de top van het pyridoxalphosphaatspectrum bij 385 mμ verdwijnt, terwijl de top bij 330 mμ sterk toeneemt. Deze laatste is karakteristiek voor pyridoxalphosphaatderivaten, die de dubbele band in conjugatie met de ring missen (21, 22).

De waargenomen remming van het GAD door penicillamine in vitro en in vivo is eveneens terug te voeren tot de vorming van een thiazolidine verbinding van het pyridoxalphosphaat (23).

Naast deze remming blijken cysteine en 2-3-dimercaptopropanol een stabiliserend effect te hebben, daar zij het enzym in de gereduceerde staat houden, hetgeen DAVISON (13) ook reeds gevonden had. Een aanwijzing voor de belangrijke rol van -SH groepen bij de enzymwerking vormt de krachtige remming door p-hydroxymercuribenzoaat (24).

Met bovenstaande gegevens in handen veronderstelt BERGERET, dat het coenzym via de -SH groepen van het apoenzym hiermede verbonden is.

3.2 Experimenteel gedeelte.

Bij toevoeging van cysteine aan hersenhomogenaten in een eindconcentratie van 4×10^{-3}M, zagen wij zowel een reactiverend als een remmend effect optreden, waarbij het van de toestand van het enzym afhing welk effect de overhand had.

Bij oudere homogenaten welke enige tijd ingevroren waren geweest overwoog de reactivering, terwijl bij verse homogenaten de remming de boventoon voerde.

Tabel 5 geeft een beeld van de invloed van cysteine en glutathion op de activiteit van een enzympreparaat in verse toestand en na 1 en 2 dagen bewaren bij 2°C.

Beide effecten zijn in nevenstaande tabel duidelijk te zien. Cysteine vertoonde dezelfde werking bij toevoeging aan een uit dit homogenaat verkregen supernatant. Het homogenaat werd hiertoe

Tabel 5

Invloed van cysteine en glutathion op de GAD-activiteit van een rattenhersenhomogenaat.

	activiteit in μl CO_2/u/500 mg		
	vers	1 dag	2 dagen
zonder toevoeging	426	285	130
+ cysteine (eindconc. 4×10^{-3}M)	375	319	219
+ glutathion "	408	332	232

bij 105.000 g gedurende 1/2 u gecentrifugeerd en het bovenstaande heldere supernatant als enzymoplossing gebruikt.

In tabel 6 zijn de activiteiten van dit supernatant bij verschillende substraatconcentraties samengevat, waarbij cysteine al of niet werd toegevoegd.

Tabel 6

Invloed van cysteine (eindconc. 4×10^{-3}M) op de activiteit van een vers supernatant 105.000 g bij verschillende substraatconcentraties.

eindconcentratie glutaminezuur	percentage activiteit	
	- cysteine	+ cysteine
6×10^{-2} M	(100)	90
4×10^{-2} M	94	78
3×10^{-2} M	89	72
2×10^{-2} M	83	60
1.5×10^{-2} M	78	52
1×10^{-2} M	66	38

Uit de gegevens van tabel 6 blijkt duidelijk de sterke remming welke optreedt bij het toevoegen van cysteine aan dit verse supernatant, vooral bij lagere substraatconcentraties.

De verandering van het spectrum van pyridoxalphosphaat bij toevoeging van cysteine, zoals in de literatuur (18, 22) beschreven, kon door ons worden bevestigd (zie fig. 2 A).

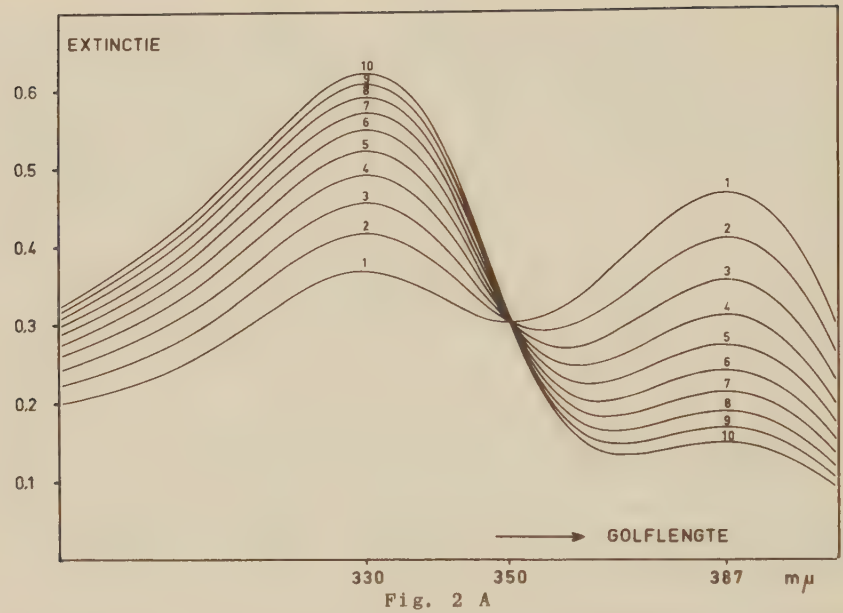

Fig. 2 A

Verandering van het spectrum van pyridoxalphosphaat bij toevoegen van cysteine.
0.2 ml 1.9 x 10^{-3}M pyridoxalphosphaat, 0.1 ml 0.1 M cysteine pH 6.3 en 2.7 ml aqua dest.
De spectra werden 1.5 min. na elkaar opgenomen. (Beckman D.K.-2 chart).

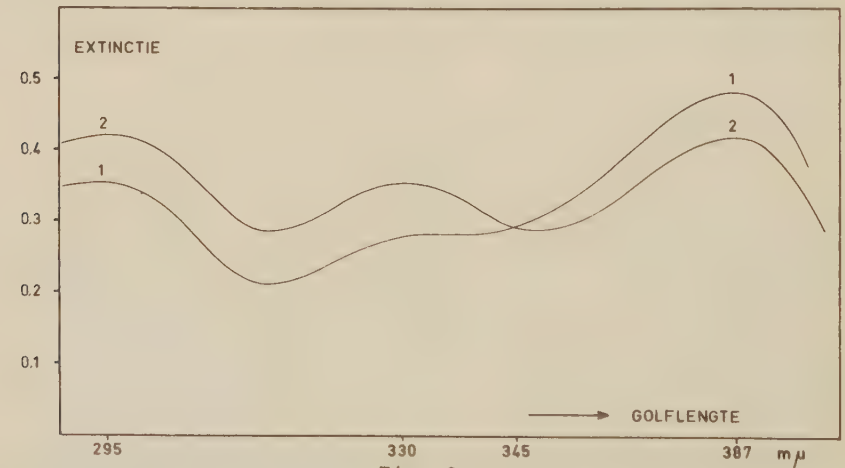

Fig. 2 B

Verandering van het spectrum van pyridoxalphosphaat bij toevoegen van 2-mercaptoaethanol.
1 0.2 ml 1.9 x 10^{-3}M pyridoxalphosphaat, 2.8 ml aqua dest.
2 0.2 ml 1.9 x 10^{-3}M pyridoxalphosphaat, 0.1 ml 0.1 M 2-mercaptoaethanol en 2.7 ml aqua dest.
De snel intredende relatief geringe verandering in het spectrum onderging daarna geen wijziging meer. (Beckman D.K. -2 chart).

Teneinde uit te maken of wij inderdaad met een enzym te maken hadden waar de -SH groepen van het apoenzym een rol vervullen bij de enzymatische katalyse, hebben wij de invloed van monojoodazijnzuur en p-chloormercuribenzoaat op de enzymatische activiteit onderzocht. Uiteraard werd bij deze proef geen -SH verbinding aan het enzympreparaat toegevoegd.

Tabel 7
Invloed van monojoodazijnzuur en p-chloormercuribenzoaat op de GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g.

eindconcentratie monojoodazijnzuur	eindconcentratie p-chloormercuribenzoaat	activiteit
-	-	(100)
4×10^{-5} M	-	100
4×10^{-4} M	-	84
4×10^{-3} M	-	12
-	5×10^{-5} M	68
-	1×10^{-4} M	50
-	1.5×10^{-4} M	31
-	2×10^{-4} M	22

Zowel monojoodazijnzuur als p-chloormercuribenzoaat remden de GAD-activiteit sterk.

Deze gegevens duiden er op dat de -SH groepen van het apoenzym een rol spelen bij de enzymatische reactie. De boven waargenomen remming bij toevoeging van cysteine kan als een competitie om het coenzym verklaard worden.

Daar het bij onze experimenten noodzakelijk was het enzym in de beste conditie te houden zonder de kans te lopen door het toevoegen van een -SH verbinding een remming te veroorzaken, gingen wij de invloed van 2-mercaptoaethanol op de GAD-activiteit na. Experimenteel bleek dat 2-mercaptoaethanol een lichte verhoging gaf van de top bij 330 mμ van het pyridoxalphosphaatspectrum en een kleine verlaging van de top bij 387 mμ, geheel in overeenstemming met de ervaringen van BUELL en HANSEN (22) (zie fig. 2 B).

Ook zij vonden een zeer snelle reactie tussen het pyridoxalphosphaat en het 2-mercaptoaethanol, waarbij een gemakkelijk te dissociëren thiohemiacetaal wordt gevormd.

Evenals bij cysteine, hebben wij de invloed van 2-mercaptoaethanol

op de enzymactiviteit nagegaan bij verschillende substraatconcentraties. Tabel 8 geeft een beeld van de activiteit welke wij verkregen bij toevoegen van 2-mercaptoaethanol aan een oud en een vers supernatant.

Tabel 8

Invloed van het 2-mercaptoaethanol (MEA) op de GAD-activiteit van een oud en vers supernatant 105.000 g bij verschillende substraatconcentraties.

eindconcentratie glutaminezuur	oud supernatant		vers supernatant	
	- MEA	+ MEA	- MEA	+ MEA
6 x 10^{-2} M	(100)	121	(100)	108
4 x 10^{-2} M	95	113	88	95
3 x 10^{-2} M	90	107	79	92
2 x 10^{-2} M	87	95	77	82
1.5 x 10^{-2} M	75	86	76	76

2-Mercaptoaethanol geeft hier inderdaad in beide gevallen een activering, welke vooral bij het verse enzym bij lagere substraatconcentraties vermindert, hetgeen begrijpelijk wordt wanneer wij bedenken dat bij deze concentraties het glutaminezuur de beperkende factor vormt en niet het aantal enzymatisch actieve plekken van het enzym.

Bij onze verdere experimenten werd steeds van 2-mercaptoaethanol als -SH verbinding gebruik gemaakt bij een eindconcentratie van 4 x 10^{-3}M.

4. Pogingen tot zuivering van het GAD.

4.1 Activiteit supernatant 105.000 g.

Bij onze pogingen op verschillende manieren het enzym te zuiveren, zijn wij steeds uitgegaan van een helder supernatant 105.000 g. Door bepaling van het eiwitgehalte volgens de methode van WARBURG en CHRISTIAN (16) waren wij in staat de activiteit van dit supernatant en van de hieruit verkregen fracties uit te drukken in μl CO_2/u/mg eiwit.

Van enige homogenaten werd nu nagegaan welk deel van de totale activiteit in het sediment en in het supernatant werd teruggevonden door centrifugeren bij 105.000 g. In tabel 9 zijn deze gegevens verzameld, waarbij tevens de specifieke activiteit van het homogenaat en van het supernatant zijn vermeld.

Tabel 9
Verdeling van de activiteit van een rattenhersenhomogenaat over sediment en supernatant door centrifugeren bij 105.000 g gedurende 1/2 u.

activiteit homogenaat in μl CO_2/u/500 mg	percentage activiteit sediment	percentage activiteit supernatant	activiteit supernatant in μl CO_2/u/mg eiwit
473	49	52	19.6
478	41	58	22.2
510	43	58	21.8

Het blijkt dus dat wij in het supernatant ruim 50% van de oorspronkelijke activiteit van het homogenaat terugvinden.
Meestal werd direct uit een grote hoeveelheid homogenaat dit supernatant bereid en in porties van 15 ml bij -20°C ingevroren, waarbij de activiteit redelijk bewaard bleef.

4.2 Zuivering door hitte-denaturering.

Wij trachtten allereerst door verwarmen van het supernatant gedurende korte tijd bij verschillende temperaturen en direct hierna afkoelen tot kamertemperatuur, een mogelijke selectieve denaturering te verkrijgen van niet enzymatisch actief eiwit.
In tabel 10 zijn de rest-activiteiten vermeld als percentages van de activiteit van het niet verwarmde supernatant.

Tabel 10
Invloed van verwarming gedurende 5 min. bij verschillende temperaturen op de GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g.

Temperatuur	45°C	50°C	55°C
Percentage rest-activiteit	82	50	13

Hoewel er bij het verwarmen bij deze temperaturen gedurende deze tijd geen zichtbare denaturering optrad en het eiwitgehalte na herhaald centrifugeren hetzelfde was als bij het niet verwarmde supernatant, bleek toch de activiteit zeer sterk achteruit te gaan, hetgeen voor ons een reden was deze methode van zuivering niet verder toe te passen.

4.3 Ammoniumsulfaat-precipitatie van het GAD.

Uitgaande van het supernatant 105.000 g, hebben wij getracht een zuivering tot stand te brengen door precipitatie van het enzym door toevoeging van een verzadigde ammoniumsulfaatoplossing, welke met geconcentreerde ammonia op pH 7.0 was gebracht.

Aan het heldere supernatant werd hiertoe in de koude 1/3 volume verzadigde ammoniumsulfaatoplossing pH 7.0 toegevoegd, waarna het neergeslagen eiwit na 30 min. werd afgecentrifugeerd. Het sediment werd opgenomen in een bekende hoeveelheid 0.05 M phosphaatbuffer pH 6.3. Aan het verkregen heldere supernatant werd nogmaals dit volume ammoniumsulfaat toegevoegd en het neergeslagen eiwit werd eveneens na centrifugatie in buffer opgenomen. Er werd nu nog 2/3 volume ammoniumsulfaat toegevoegd en het neergeslagen eiwit op dezelfde manier behandeld.

Van de drie aldus verkregen fracties, alsmede van het oorspronkelijke supernatant, werd de activiteit bepaald. Teneinde een indruk te krijgen van de totaal teruggevonden activiteit is in tabel 11, behalve de specifieke activiteit, ook de totale activiteit van ieder der fracties vermeld.

Tabel 11

GAD-activiteit van verschillende fracties van een supernatant 105.000 g, verkregen door precipitatie van het eiwit door ammoniumsulfaat.

	activiteit in μl CO_2/u/mg eiwit	totale activiteit der fractie
supernatant 105.000 g	18.2	(100)
fractie I (0-1/3 vol)	8.9	10
„ II (1/3-2/3 vol)	12.2	28
„ III (2/3-4/3 vol)	5.7	12

Uit deze gegevens zien wij dat fractie II nog het meest actief is, hoewel de totale activiteit slechts 28% bedraagt van de activiteit van het oorspronkelijke supernatant. Er treedt dus een beduidend verlies op aan totale activiteit, zonder een winst aan specifieke activiteit.

Een oorzaak van deze lage activiteit kon gelegen zijn in de eventueel remmende werking van het in de fracties resterende ammoniumsulfaat. Om dit te onderzoeken hebben wij aan een supernatant zeer kleine hoeveelheden van dit zout toegevoegd, waarbij geen enkel eiwitneerslag ontstond en uit de verkregen gegevens, welke in tabel 12 verzameld zijn, blijkt er een zeer sterke remming op te treden.

Tabel 12

Invloed van ammoniumsulfaat op de GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g.

eindconcentratie ammoniumsulfaat	activiteit	eindconcentratie ammoniumsulfaat	activiteit
-	(100)	0.12 M	33
0.04 M	63	0.16 M	26
0.08 M	44	0.20 M	19

Een verwijdering van het in de fracties achtergebleven ammoniumsulfaat bleek dus noodzakelijk, waarbij in eerste instantie gedacht werd aan dialyseren.

Uit dialyseproeven, welke wij verricht hadden bij een supernatant 105.000 g, was echter komen vast te staan, dat 1 nacht dialyseren tegen 0.05 M phosphaatbuffer pH 6.3, welke tevens 5 x 10^{-3}M voor 2-mercaptoaethanol was, de GAD-activiteit van het supernatant tot de helft teruggebracht.

Wij hebben dit voorval geweten aan de lange duur van de dialyse en hebben daarom onze toevlucht genomen tot een snellere methode van verwijdering van het ammoniumsulfaat.

Hierbij maakten wij gebruik van een vrij nieuwe chromatografische scheidingsmethode in de vorm van dextraan-gelfiltratie. Het gel, bestaande uit hydrophiele ketens met vele vertakkingen, is vrij van geioniseerde groepen, terwijl het polaire karakter geheel te danken is aan het grote aantal hydroxylgroepen (25, 26). De scheiding berust hier primair op een verschil in molecuulgrootte, waar-

bij de macromoleculen zich bewegen door de zich tussen de geldeeltjes bevindende vloeistof, terwijl de laag moleculaire verbindingen deze penetreren in een mate, welke afhankelijk is van hun moleculaire afmetingen en van de hoeveelheid vertakkingen van het gel. Bij onze experimenten gebruikten wij Sephadex G-50, waarbij alle verbindingen met een moleculair gewicht groter dan 10.000, de kolom ongehinderd passeren.

Uit proeven waarbij wij het supernatant bij 2°C over een kolom Sephadex G-50 voerden welke 25 cm lang was met een doorsnede van 2 cm en die opgenomen was in 0.05 M phosphaatbuffer pH 6.3, bleek, dat het preparaat zowel zijn totale als zijn specifieke activiteit behield. Deze methode was bijzonder geschikt om laagmoleculaire verontreinigingen kwijt te raken, doch heeft het bezwaar dat er steeds een verdunning optreedt, welke op zijn gunstigst een factor 3 bedraagt.

De verschillende eiwitfracties, welke wij bij de ammoniumsulfaatprecipitaties verkregen hadden, werden nu over deze kolom gevoerd en van het eluaat werd de activiteit bepaald.

In tabel 13 zijn de specifieke en de totale activiteit van verschillende fracties vermeld, zowel vóór als na de Sephadex behandeling. Een ernstig probleem bij deze experimenten vormde het feit, dat wij niet in staat waren de gehele hoeveelheid eiwit welke bij toevoeging van 1/3 volume ammoniumsulfaat aan het supernatant neersloeg, na centrifugeren weer in oplossing te brengen. Ook bij gecombineerd neerslaan van fractie I en II bleef er een onoplosbare rest achter. Bij gecombineerd neerslaan van de fracties I + II + III ging de totale hoeveelheid eiwit echter direct in oplossing. Het neerslag dat ontstond bij toevoeging van 1/3 volume ammoniumsulfaat aan deze laatste gecombineerde eiwitoplossing gaf echter wederom een slechts gedeeltelijk oplosbaar neerslag.

Wij hebben nog getracht het onoplosbare eiwit van fractie I in 0.05 M phosphaatbuffer, welke met sterk NaOH op pH 8.0 was gebracht op te lossen, doch ook dit had een negatief resultaat, terwijl desoxycholzuur evenmin solubiliserend werkte.

ROBERTS en FRANKEL (11) klagen bij hun pogingen tot zuivering van het enzym eveneens over de moeilijke oplosbaarheid daarvan.

Gedeeltelijk uit deze directe metingen en voor een deel uit extrapolatie hiervan, kunnen wij concluderen dat de enzymactiviteit over alle fracties verdeeld is, met een laagste totaalactiviteit bij fractie III, terwijl de specifieke activiteit van fractie I het hoogst is.

Tabel 13

GAD-activiteit van verschillende fracties van een supernatant 105.000 g, verkregen door precipitatie van het eiwit door ammoniumsulfaat vóór en na het voeren over een Sephadex G-50 kolom.

	activiteit in μl CO_2/u/mg eiwit	totale activiteit der fractie
Supernatant	19.6	(100)
fr. I (0-1/3 vol)	16.3	10
idem na Sephadex	27.7	13
fr. II (1/3-2/3 vol)	16.3	23
idem na Sephadex	27.3	34
Supernatant	19.7	(100)
fr. I (0-1/3 vol)	21.2	9
idem na Sephadex	30.4	14
fr. comb. II+III (1/3-4/3 vol)	5.8	15
idem na Sephadex	13.2	49
Supernatant	22.1	(100)
fr. comb. I+II (0-2/3 vol)	16.4	38
idem na Sephadex	23.3	53
Supernatant	21.6	(100)
fr. comb. I+II+III (0-4/3 vol)	5.6	26
idem na Sephadex	19.7	86
Supernatant	17.7	(100)
fr. comb. I+II+III (0-4/3 vol) na Sephadex	14.2	78
fr. Ia (0-1/3 vol in comb. I+II+III) na Sephadex	18.8	16

4.4 Precipitatie van het GAD bij pH 5.0.

Daar wij, om tot een zuivering van het GAD te geraken, het eiwit van het supernatant gaarne wilden scheiden van de vele andere verbindingen welke in dit extract voorkwamen, hebben wij getracht het enzym neer te slaan door verhoging of verlaging der zuurgraad. Uit oriënterende proeven bleek dat er geen eiwitneerslag ontstond

bij verhoging van de pH tot 8.0, doch dat een verlaging van de pH tot 5.0 een zwaar eiwitneerslag deed ontstaan, terwijl bij nog lagere pH een deel hiervan weer in oplossing ging.

Wij bereikten deze pH-verlaging door aan het supernatant 105.000 g een gelijk volume 0.1 M KH_2PO_4 toe te voegen en daarna met verdund phosphorzuur de pH op 5.0 te brengen. Het verkregen neerslag werd nu afgecentrifugeerd en daarna opgenomen in 0.05 M phosphaatbuffer pH 6.3. Ondanks lang roeren ging slechts een beperkt deel van het eiwit in deze buffer in oplossing, zodat wij genoodzaakt waren, teneinde een heldere eiwitoplossing te krijgen, de onoplosbare rest af te centrifugeren.

Tabel 14 geeft een indruk van de activiteiten, welke de op deze wijze verkregen fracties opleverden, terwijl tevens in een kolom de totale activiteiten der fracties vermeld zijn als de percentages van de activiteit van het oorspronkelijke supernatant.

Tabel 14
GAD-activiteit van de oplosbare fractie van het bij pH 5.0 neergeslagen eiwit.

activiteit supernatant in μl CO_2/u/mg eiwit	activiteit pH 5.0 fractie in μl CO_2/u/mg eiwit	percentage totale activiteit der fractie
20.1	44.0	39
21.6	35.2	26
22.7	45.4	39
20.7	32.4	15
8.9	25.7	39
20.4	39.3	21
21.1	42.1	27

Een extraheren met water i.p.v. met buffer van het bij pH 5.0 neergeslagen eiwit leverde geen verbetering op, doch gaf een activiteit van dezelfde grootte-orde.

Het, bij het afcentrifugeren van het bij pH 5.0 neergeslagen eiwit, achterblijvende supernatant had een lagere specifieke activiteit dan het oorspronkelijke supernatant en leverde als fractie slechts 15% of minder op van de totaal aanwezige activiteit.

Ook hier hebben wij getracht het onoplosbare eiwit bij pH 8.0 in oplossing te krijgen, evenwel zonder bruikbaar resultaat.

Het moeilijk in oplossing krijgen van het eenmaal neergeslagen enzym speelt ons ook bij deze pogingen tot enzymzuivering parten en is ongetwijfeld de oorzaak van het feit dat wij slechts een deel van de oorspronkelijke activiteit terugvinden. Een duidelijk winstpunt bij deze methode is echter het feit dat de specifieke activiteit van al deze fracties aanzienlijk hoger ligt dan de specifieke activiteit van het oorspronkelijke supernatant.

5. Electrophorese proeven.

5.1 Scheiding der eiwitten.

Bij onze pogingen electrophoretisch een scheiding van de eiwitten zoals deze in onze preparaten voorkwamen, tot stand te brengen en daarmede een enzymconcentrering te verkrijgen, hebben wij gebruik gemaakt van de zetmeelblok-electrophorese, volgens de door BLOEMENDAL (27) beschreven methode.

De verticale opstelling van het zetmeelblok bij deze methode, met de anode op de laagste plaats en een onderlinge afstand van 20 cm. tussen de beide buffervaten, maakt dat de electro-endosmose tot een minimum beperkt blijft.

Het zetmeel bevond zich in een Perspex bak van 40 x 4 x 2 cm., geheel vervaardigd volgens het voorschrift van BLOEMENDAL. De verbinding met de beide electrodevaten bestond uit een brug van opgevouwen filtreerpapier, welke omhuld was met parafilm. Het zetmeel werd na uitvoerig met aqua dest. gewassen te zijn opgenomen in 0.01 M natriumphosphaatbuffer pH 7.7.

Na 1 uur stroom doorleiden, teneinde de kolom te equilibreren, werd het enzympreparaat op 6 cm. afstand van de kathode aangebracht. Wij verwijderden daartoe een 1 cm. brede reep uit de kolom en vulden het ontstane gat op met een bijna vaste suspensie van zetmeel met 0.6 ml 0.1 M 2-mercaptoaethanol en 6 ml van ons enzympreparaat, ongeveer 7 mg eiwit per ml bevattend.

De duur van de electrophorese, bij een stroomsterkte van 12 mA en een potentiaalverschil van 190 V tussen beide uiteinden van de kolom, bedroeg 15 u. De scheiding geschiedde bij 2°C.

5.2 Bepaling eiwitconcentraties.

Na beëindiging der scheiding hebben wij op 2 manieren getracht de eiwitverdeling over de kolom en de eventuele enzymatische activiteit van een der eiwitfracties na te gaan.

Allereerst kregen wij een zeer grove indruk van de eiwitverdeling door in de lengterichting van het zetmeelblok een strip Whatmanpapier nr. 1 op het zetmeel aan te brengen, welke na enige tijd hiervan verwijderd werd, vervolgens werd gedroogd bij 110°C en met azokarmijn werd gekleurd.

De aldus behandelde strip gaf een vrij vaag beeld van de eiwitverdeling over de kolom, waarbij echter geen duidelijke banden te onderscheiden waren.

Een duidelijker beeld van de scheiding der eiwitten kregen wij door elutie van het zetmeelblok. Met behulp van een snijapparaat werd het blok hiertoe verdeeld in 40 gelijke fracties van 1 x 4 x 2 cm., waarbij de eerste en de laatste fractie vervielen daar deze plaatsen gedeeltelijk gebruikt waren voor de bevestiging der papieren contactstrips. De aldus verkregen zetmeelblokjes werden nu met 0.05 M phosphaatbuffer pH 6.3 gewassen en in het eluaat werd de eiwitconcentratie bepaald met Folin-Ciocalteu phenolreagens volgens de methode van LOWRY (28).

Figuur 3 geeft een beeld van de verdeling van het eiwit over de kolom. Op ongeveer 10 cm. afstand van de kathode bevond zich een rode band, welke wij aan haemoglobine toeschreven, waarmede het gebruikte supernatant was verontreinigd.

5.3 Activiteitsbepaling der fracties.

Voor het bepalen van de enzymatische activiteit der eiwitfracties hebben wij 2 methoden gevolgd.

Allereerst hebben wij na de electrophoretische scheiding der eiwitten in de lengterichting op het zetmeelblok een papierstrook (40 x 2 cm.) aangebracht, welke gedrenkt was in een mengsel van phosphaatbuffer, glutaminezuur, pyrodoxalphosphaat en mercaptoaethanol, in een verhouding zoals deze bij het incuberen van het enzym werd gebruikt. Het blok met de daarop aangebrachte strip werd nu gedurende 2 uur bij 37°C weggezet in een droge omgeving. De strip werd hierna van het blok verwijderd, gedroogd en hiervan werd in de lengte een 1 cm. brede strook afgeknipt. Met behulp van een radeerwieltje

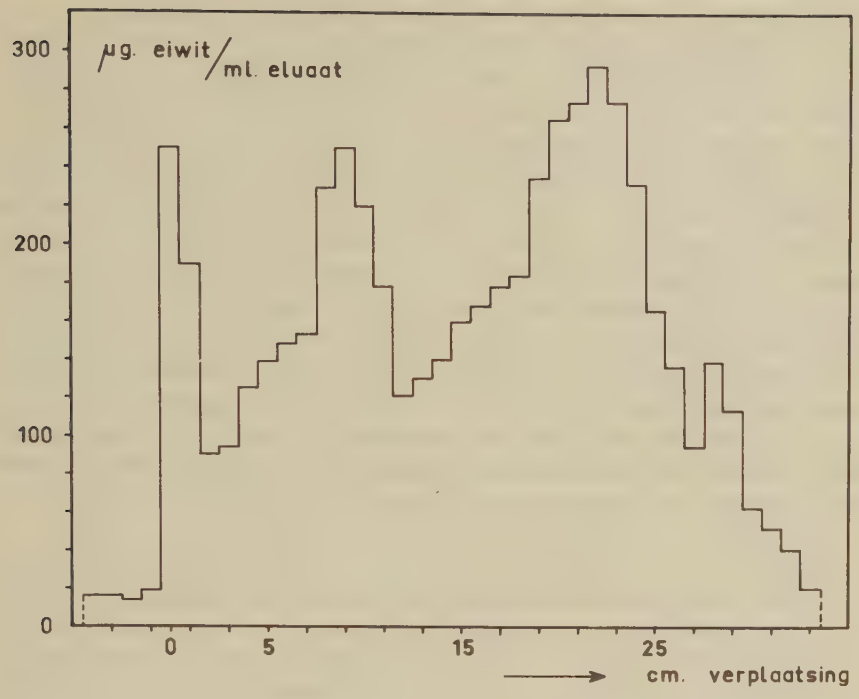

Fig. 3

Verdeling van het eiwit uit het supernatant 105.000 g over de zetmeelkolom.
Tijd: 15 uur; 190 V; 12 mA; 0.01 M natriumphosphaatbuffer pH 7.7.
Opgebracht 6 ml supernatant 105.000 g.
Iedere fractie geëlueerd met 5 ml 0.05 M phosphaatbuffer pH 6.3.

werd aan één lengte-zijde van de strook een groot vel Whatman-papier nr. 1 bevestigd en aan de andere zijde een kleiner vel, dat diende als contactstrook met de loopvloeistof *). Deze bevestiging voldeed uitstekend en het was zo mogelijk loodrecht op de richting der electrophoretische scheiding de reeds aanwezige en eventueel ontstane producten chromatografisch te scheiden.

Als loopvloeistof werd gebruikt butanol-ijsazijn-water (4 : 1 : 1). Wij hoopten op deze wijze ergens GABA te kunnen aantonen naast het

*) Dit geschiedt door beide papieren met een smalle rand over elkaar te leggen en hierover het radeerwieltje stevig aandrukkend te bewegen. Er ontstaat zodoende een lijn van beide lagen doordringende gaatjes, waardoor een voldoende verbinding tot stand komt.

overal aanwezige glutaminezuur. Inderdaad was dit het geval, doch dit regelmatig op dezelfde plek verschijnend GABA bleek niet enzymatisch te zijn gevormd, maar was slechts het nog in het supernatant aanwezige deel van de endogene hoeveelheid GABA der hersenen. Een extra toevoegen van GABA aan het te scheiden supernatant gaf een sterke toename van deze stof op dezelfde plek van het chromatogram.

Tenslotte hebben wij nog getracht op de gebruikelijke wijze een enzymatische activiteit in een der eluaten der fracties aan te tonen, doch geen der fracties bleek enige activiteit te vertonen. De mogelijkheid bestond dat het gebruikte zetmeel de oorzaak was van deze inactivering, doch wij waren in staat uit de suspensie van zetmeel en supernatant, zoals wij die bij het begin der scheiding bereidden, een actief eluaat te verkrijgen, dat ongeveer 60% van de totale activiteit van het gebruikte supernatant bevatte. Verschillende andere factoren, waaronder de tijdsduur, zullen voor deze inactivering verantwoordelijk gesteld moeten worden.

6. Samenvatting en conclusies.

Bij het overzien van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten kunnen wij concluderen, dat wij er in geslaagd zijn, uitgaande van de uit de literatuur bekende gegevens, een zeer reproduceerbare methode tot testen van hersenextracten op hun GAD-activiteit te ontwikkelen.

Het bewaren van homogenaten van hersenweefsel en van de daaruit bij 105.000 g bereide supernatants bij $-20^{\circ}C$ bleek goed mogelijk te zijn, vooral indien aan deze extracten bij de meting een -SH verbinding werd toegevoegd.

Als reducerend agens werd het 2-mercaptoaethanol ingevoerd, hetwelk als zodanig uitstekend bleek te voldoen zonder op andere wijze bij de enzymatische reactie te interfereren.

De remming welke bij toevoeging van monojoodazijnzuur en p-chloormercuribenzoaat optrad, bevestigde het uit de literatuur bekende feit, dat het GAD voor zijn enzymatische werking vrije -SH groepen nodig heeft.

Onze pogingen tot zuivering van het GAD hadden weinig succes, alhoewel wij er in slaagden reproduceerbaar enige fracties met gelijke of hogere specifieke activiteit dan die van het oorspronkelijke supernatant te isoleren. Uitgaande van een hersenhomogenaat met een activiteit van ongeveer 450 μl CO_2/u/500 mg weefsel kregen wij een supernatant 105.000 g met een activiteit van 20 μl CO_2/u/mg

eiwit. Door neerslaan van het eiwit bij pH 5.0 en opname in buffer verkregen wij een eiwitoplossing met een specifieke activiteit van ± 40 μl CO_2/u/mg eiwit hetgeen echter gepaard ging met een ernstig verlies aan totale activiteit.

Het grootste probleem bij deze zuivering vormde steeds het feit, dat een deel van het geïsoleerde eiwit moeilijk oplosbaar is, hetgeen ook uit de literatuur bekend was. Het feit dat een gecombineerd neerslaan van al het aanwezige eiwit door ammoniumsulfaat een bijzonder goed oplosbaar eiwitmengsel oplevert, zou kunnen wijzen op de mogelijkheid dat wij bij onze fractionering eiwitten of andere macromoleculaire verbindingen, welke elkaar in oplossing houden, van elkaar scheiden. Anderzijds is het de vraag of een gecombineerd eiwitneerslag dezelfde componenten bevat als een mengsel van de afzonderlijke neerslagen, hetgeen een vergelijking tussen beide niet geheel verantwoord doet zijn.

De negatieve resultaten bij het aantonen van een enzymatische activiteit in een der fracties van het electropherogram kunnen moeilijk uit onze nog schaarse gegevens geheel verklaard worden, doch inactivering van het enzym tengevolge van de lange duur van het experiment en van het door ons gebruikte electrische veld moet zeker onder ogen worden gezien.

LITERATUUR

1. R. Shukuya, G.W. Schwert — J.Biol.Chem. 235, 1649 (1960).
2. E.F. Gale — Adv.Enzymol. 6, 1 (1946).
3. V.A. Najjar, J. Fisher — J.Biol.Chem. 206, 215 (1954).
4. E. Roberts — J.Biol.Chem. 198, 495 (1957).
5. J.A. Anderson, V.H. Cheldelin, T.E. King — J.Bacteriol. 82, 354 (1961).
6. H. Beevers — Biochem. J. 48, 132 (1951).
7. J.E. Smith, E.R. Waygood — Can.J.Biochem.Physiol. 39, 1055 (1961).
8. St. Böttger, W.Steinmetzer — Zeitschr.f.Zückerind. 10, 235 (1960).
9. W.J. Wingo, J. Awapara — J.Biol.Chem. 187, 267 (1950).
10. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 188, 789 (1951).
11. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 190, 505 (1951).
12. E. Roberts, F. Younger, S. Frankel — J.Biol.Chem. 191, 277 (1951).
13. A.N. Davison — Biochim.Biophys.Acta 19, 66 (1956).
14. G. Steensholt, P.E. Joner — Acta Chem.Scand. 11, 1079 (1957).
15. T. Hado — Nagoya Med.J. 5, 203 (1960).
16. O. Warburg, W. Christian — Biochem.Z. 310, 384 (1941).
17. H. Lineweaver, D. Burk — J.Am.Chem.Soc. 56, 658 (1934).
18. B. Bergeret, F. Chatagner, C. Fromageot — Biochim.Biophys.Acta 22, 329 (1956).
19. C. de Marco — Biochim.Biophys.Acta 25, 634 (1957).
20. D. Heyl, S.A. Harris, K. Folkers — J.Am.Chem.Soc. 70, 3429 (1948).
21. H.N. Christensen — J.Am.Chem.Soc. 80, 99 (1958).
22. M.V. Buell, R.E. Hansen — J.Am.Chem.Soc. 82, 6042 (1960).
23. M. Matsudo, K. Makino — Biochim.Biophys.Acta 48, 192 (1961).
24. D.G. Simondsen, E. Roberts — Fed.Proc. 20, 239 (1961).
25 J. Porath, P. Flodin — Nature 183, 1657 (1959).
26. P. Flodin — J.Chromatog. 5, 103 (1961).
27. H. Bloemendal — J.Chromatog. 2, 121 (1959).
28. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall — J.Biol.Chem. 193, 265 (1951).

IV INTRACELLULAIRE LOCALISATIE VAN HET GAD IN HERSENWEEFSEL

1. Inleiding.

De in dit hoofdstuk beschreven experimenten hadden tot doel een indruk te krijgen van de intracellulaire localisatie van het GAD in hersenweefsel. Wij hoopten dat een oplossing van dit probleem ons misschien zou helpen de bijzondere rol van het GAD en van het GABA in dit weefsel beter te begrijpen.

2. Literatuuroverzicht.

Ondanks de zeer uitgebreide literatuur over het voorkomen van het GAD in de hersenen en de belangrijke rol van dit enzymsysteem, is er zeer weinig bekend over de localisatie van dit enzym in de cel.

De meeste onderzoekers hebben zich beperkt tot experimenten met homogenaten uit vers hersenweefsel of uit acetonpoeder van hersenen en vermelden geen proeven waarbij metingen worden verricht aan scherp omschreven celbestanddelen.

SIMONDSEN (1) vermeldt in een voorlopige mededeling, dat bij fractionering door centrifugatie in een sucrose-medium het grootste deel der activiteit teruggevonden wordt in het bij laag toerental verkregen residu.

Daar verdere gegevens, zoals molariteit der sucrose-oplossing en het toerental waarbij dit residu werd verkregen, ontbreken, is het onmogelijk deze vaag omschreven resultaten met de onze te vergelijken.

McKHANN en TOWER (2, 3) vermoeden, dat zowel het GAD als het GABA-barnsteenzuursemialdehyde-transaminase gelocaliseerd zijn in de mitochondriën der neuronen, doch zij voeren hiervoor slechts de relatief hoge GABA-concentratie in de geïsoleerde mitochondriën als bewijs aan.

Tijdens ons onderzoek verscheen er een publicatie van LØVTRUP (4), waarin hij enige experimenten vermeldt waarbij de GAD-activiteiten in verschillende celfracties van rattenhersenen is gemeten. Hij werkt daarbij in een 0.44 M sucrose milieu. De verdeling der

activiteiten van de verschillende fracties uitgedrukt als percentages van de activiteit van het oorspronkelijke homogenaat ziet er als volgt uit:

Kernen	2100 g/10 min.	± 20 %
Mitochondriën	14500 g/15 min.	± 4 %
Microsomen	53500 g/ 1 uur	± 24 %
Supernatant		± 34 %

Hij vermoedt dat de hoge activiteit van de kernen te wijten is aan resterende intacte cellen en dat de activiteit van de microsomen berust op verontreiniging van deze fractie door het supernatant. Met deze gegevens in handen twijfelt hij ernstig aan de bewering van McKHANN en TOWER dat het GAD in de mitochondriën gelocaliseerd zou zijn.

3. Methoden.

De door ons toegepaste methode van scheiding van verschillende celfragmenten berust op het centrifugeren van een homogenaat van hersenen in een 0.25 M sucrose-oplossing, evenals bij de door BRODY en BAIN (5) beschreven methode. Wij voegden aan deze sucrose-oplossing mercaptoaethanol toe tot een eindconcentratie van 1×10^{-2}M. Voor de Warburgmeting werd 1.0 ml van de verkregen fractie gebruikt en zoals gebruikelijk op zijn activiteit getest. De hersenen waren afkomstig van volwassen ratten. Na isolering der hersenen werden deze in de ijskoude sucrose-oplossing gewassen, vervolgens gewogen en gehomogeniseerd. De concentratie van het homogenaat bedroeg steeds 200 mg weefsel per ml homogenaat. Het homogeniseren geschiedde in een homogenisator volgens POTTER-ELVEHJEM, voorzien van een Perspex stamper. De duur van het homogeniseren bedroeg 2 minuten. Na het homogeniseren werden steeds eventueel resterende weefselresten afgefiltreerd door kaasdoek.

Nadat van het aldus verkregen homogenaat een deel was afgenomen voor het meten van de totale activiteit, werd het resterende deel gedurende 15 minuten bij 800 g gecentrifugeerd. Wij maakten hiervoor gebruik van een Phywe centrifuge, type "Eispirouette".

Nadat het supernatant verwijderd was, werd het residu opgenomen in een kleine hoeveelheid sucrose-oplossing en werd weer bij 800 g gedurende 15 minuten gecentrifugeerd. Het residu werd nu met de sucrose-oplossing aangevuld tot een bekend volume en leverde de kernen + celwanddebris-fractie op. De beide supernatants werden samengevoegd en gecentrifugeerd gedurende 30 minuten bij 20.000 g.

Het ontstane residu werd met sucrose aangevuld tot een bekend volume en leverde de mitochondriënfractie op. Het supernatant werd nu op de Spinco-L met rotor 40 gedurende een uur bij 105.000 g gecentrifugeerd en het gevormde residu werd tot een bekend volume met sucrose-oplossing aangevuld. Tenslotte werd het volume van het supernatant gemeten, zodat van alle fracties hun bijdrage tot de totale activiteit berekend kon worden. Alle bovenstaande bewerkingen werden bij 2°C verricht.

De isolering der verschillende fracties werd microscopisch gevolgd. Wij maakten hiervoor gebruik van een phase-contrast microscoop, voorzien van olie-immersie.

Microscopisch zag de mitochondriënfractie er homogeen uit met zeer weinig verontreiniging van kernen of celwandfragmenten, terwijl er in de kernfractie zeer weinig mitochondriën achterbleven. Het blijft echter altijd een probleem quantitatief de bijdrage van de fracties tot de totale activiteit te bepalen, zonder, door uitvoerig wassen, te komen tot een zeer verdunde laatste supernatant, waarvan de activiteit in dat geval niet nauwkeurig is te bepalen. Het testen der fracties op hun activiteit geschiedde voor alle fracties gelijktijdig en er werd steeds onder optimale omstandigheden gewerkt.

4. Resultaten.

Allereerst werden enige experimenten gedaan om de activiteit van de verschillende door centrifugatie verkregen fracties te meten. De resultaten hiervan zijn samengevat in tabel 15, waarbij de activiteiten der fracties zijn uitgedrukt als percentages van de activiteit van het oorspronkelijke homogenaat, welke waarde in de eerste kolom vermeld staat.

Tabel 15

GAD-activiteit van verschillende celfracties van een in 0.25 M sucrose bereid rattenhersenhomogenaat.

activiteit homogenaat in μl CO_2/u/500 mg weefsel	percentage activiteit			
	kernen + debris	mitochondriën	microsomen	supernatant
228	27	4	1	51
230	31	5	3	56
228	29	7	4	54

Bij nadere beschouwing van de in tabel 15 vermelde gegevens valt direct de bijzonder lage activiteit van het sucrose-homogenaat op. Deze waarde is ongeveer de helft van die welke wij verkrijgen bij een in aqua dest. bereid homogenaat.

Wij overwogen dat de in het incubatiemengsel aanwezige hoeveelheid sucrose verantwoordelijk zou kunnen zijn voor deze lage activiteit. Om dit na te gaan hebben wij aan een in aqua dest. bereid supernatant 105.000 g verschillende hoeveelheden sucrose toegevoegd en hiervan de activiteit gemeten.

Tabel 16 geeft een indruk van dit experiment.

Tabel 16

GAD-activiteit van een in aqua dest. bereid hersenhomogenaat bij toevoeging van verschillende hoeveelheden sucrose.

eindconcentratie sucrose	-	0.05 M	0.075 M	0.1 M	0.15 M
activiteit in μl CO_2/u/500 mg weefsel	440	440	418	423	430

Gezien het feit dat de eindconcentratie sucrose bij de in tabel 15 beschreven proeven 0.10 M is, kunnen wij aan de hand van de in tabel 16 genoemde gegevens besluiten dat de lage activiteit van onze sucrose-homogenaten niet aan een remmende werking van het sucrose te wijten is.

Een lage enzymactiviteit van dit homogenaat zou ook veroorzaakt kunnen zijn door in dit sucrose-homogenaat in stand gebleven enzymbindende structuren. Deze structuren zullen, vergeleken met de in vivo situatie, tijdens het homogeniseren worden beschadigd. Het is daarom voorstelbaar dat het GAD, hoewel normaal in structuren (celwand ?) opgenomen functionerend, na homogeniseren aan een "in vitro" structuur niet meer actief is.

Een dissociatie van het enzym uit deze gebonden vorm zou dan tot verhoogde activiteit kunnen voeren.

Toevoeging van desoxycholzuur leek voor dit doel het meest geschikt, gezien de voor deze stof algemeen bekende toepassing als dissocierend agens in deze zin.

Teneinde de invloed van deze stof na te gaan voegden wij aan een in 0.25 M sucrose bereid hersenhomogenaat en aan een hieruit door centrifugatie bij 105.000 g verkregen sediment en supernatant verschillende hoeveelheden van deze stof toe.

De resultaten zijn samengevat in tabel 17.

Tabel 17

Invloed van verschillende concentraties desoxycholzuur op de GAD-activiteit van een in 0.25 M sucrose bereid hersenhomogenaat en hieruit door centrifugatie bij 105.000 g verkregen fracties.

eindconc. desoxy-cholzuur	act.hom. in μl CO_2/u/500 mg weefsel	act.hom. in μl CO_2/u/ml	act.sed. in μl CO_2/u/ml	act.sup. in μl CO_2/u/ml
-	250	100	34	53
7.5×10^{-4}M	245	98	45	50
1.5×10^{-3}M	488	195	103	42
3×10^{-3}M	425	170	100	13
6×10^{-3}M	388	155	102	0
1.2×10^{-2}M	270	108	80	0

Deze gegevens laten een duidelijk hogere enzymactiviteit zien bij bepaalde desoxycholzuurconcentraties. Bij hogere desoxycholzuurconcentraties treedt er echter weer een vermindering van activiteit op. Dit remmende effect is zeer duidelijk bij het supernatant waar te nemen. De hoogste activiteit welke wij bij toevoeging van desoxycholzuur aan het sucrose-homogenaat vinden i.c. 488 μl CO_2/u/500 mg weefsel klopt zeer fraai met de door ons bij waterige hersenhomogenaten verkregen waarden (zie de tabellen 9 en 18).

Een toevoegen van desoxycholzuur aan een in aqua dest. bereid homogenaat en aan hieruit verkregen fracties leverde de in tabel 18 vermelde gegevens op.

Tabel 18

Invloed van verschillende concentraties desoxycholzuur op de GAD-activiteit van een in aqua dest. bereid hersenhomogenaat en hieruit door centrifugatie bij 105.000 g verkregen fracties.

eindconc. desoxy-cholzuur	act.hom. in μl CO_2/u/500 mg weefsel	act.hom. in μl CO_2/u/ml	act.sed. in μl CO_2/u/ml	act.sup. in μl CO_2/u/ml
-	510	204	88	118
7.5×10^{-4}M	430	172	70	72
1.5×10^{-3}M	452	181	71	58
3×10^{-3}M	390	156	63	40

Deze gegevens tonen aan dat er hier slechts een remming optreedt, vergelijkbaar met de remming welke wij zagen bij een toevoegen van desoxychlozuur aan het sucrose-supernatant 105.000 g.

Uit het feit dat desoxycholzuur niet in staat is een verhoging van activiteit van het in aqua dest. bereid homogenaat teweeg te brengen, kunnen wij een aanwijzing zien dat wij hier àl het aanwezige GAD meten en er geen sprake is van eventueel nog aan structuur gebonden GAD, dat door ongunstige opstelling niet enzymatisch actief is.

Uit de hierboven beschreven experimenten blijkt duidelijk dat een homogeniseren der hersenen in 0.25 M sucrose en daarna bepalen der GAD-activiteit in de verkregen fracties, ons geen indruk geeft van de localisatie van het enzym, daar slechts een deel van het totaal aanwezige enzym actief in de meting wordt betrokken. Wij hebben nu getracht door toevoeging van desoxycholzuur aan de verschillende in tabel 15 beschreven fracties een beeld te krijgen van de verdeling van het GAD hierover. Wij hebben hier gewerkt bij een eindconcentratie desoxycholzuur van 1.5×10^{-3}M, d.w.z. de concentratie waarbij de hoogste activiteit werd gemeten (zie tabel 17). Tabel 19 geeft een overzicht van de gevonden waarden.

Tabel 19

GAD-activiteit van verschillende celfracties, verkregen door centrifugatie bij 105.000 g van een in 0.25 M sucrose bereid homogenaat, met en zonder toevoeging van desoxycholzuur aan de fracties (eindconc. 1.5×10^{-3}M).

(activiteit in μl CO_2/u/ml)

	zonder desoxycholzuur	met desoxycholzuur
homogenaat	228	455
kernen + debris	66	213
mitochondriën	16	36
microsomen	9	8
supernatant	123	50

Ook hier zien wij een duidelijk hogere activiteit van het homogenaat en de kern + debris-fractie bij toevoeging van desoxycholzuur en een remming door deze verbinding bij het supernatant.

Naast desoxycholzuur gingen wij tevens de werking na van cholzuur,

welke verbinding op grond van zijn gelijkenis met desoxycholzuur eveneens een dergelijke interactie zou kunnen vertonen.

Tabel 20 geeft een beeld van de hierbij verkregen resultaten.

Tabel 20

Invloed van verschillende concentraties cholzuur op de GAD-activiteit van een in 0.25 M sucrose bereid hersenhomogenaat en door centrifugatie bij 105.000 g hieruit verkregen fracties.

eindconc. cholzuur	act.hom. in μl CO_2/u/500 mg weefsel	act.hom. in μl CO_2/u/ml	act.sed. in μl CO_2/u/ml	act.sup. in μl CO_2/u/ml
-	230	92	36	57
1.5×10^{-3}M	255	102	49	48
3×10^{-3}M	288	115	67	36
4.8×10^{-3}M	363	145	127	27
6×10^{-3}M	288	115	84	24

Uit deze cijfers blijkt dat cholzuur eenzelfde werking vertoont als desoxycholzuur, hoewel de maximale activiteit bij een andere eindconcentratie wordt bereikt en lager blijft dan bij een toevoegen van desoxycholzuur.

Uit onderzoekingen over de werking van glutaminezuur dehydrogenase (6, 7) bleek, dat β-oestradiol en stilboestrol in staat waren een dissociatie van dit enzym in subeenheden met gewijzigde enzymatische eigenschappen te veroorzaken. Het leek ons nuttig de interactie van deze verbindingen met het GAD, zoals het in ons sucrose-homogenaat en de verschillende fracties voorkwam, na te gaan en te testen of deze verbindingen een met de desoxycholzuur werking vergelijkbare invloed zouden vertonen.

Daar deze verbindingen onoplosbaar zijn in 0.1 M phosphaatbuffer pH 6.3 hebben wij deze stoffen, opgelost in 1.2 propyleenglycol, toegevoegd, terwijl wij tevens de invloed van dit oplosmiddel nagingen.

Uit de in tabel 21 vermelde gegevens blijkt dat noch β-oestradiol, noch stilboestrol een effect vertonen dat vergelijkbaar is met de werking van desoxycholzuur. Experimenteel bleek dat ook hogere concentraties van beide verbindingen niet tot een positief resultaat voerden.

Tabel 21

Invloed van stilboestrol (eindconc. 3.5×10^{-5}M) en β-oestradiol (eindconc. 3.5×10^{-5}M), beide opgelost in 1.2 propyleenglycol op de GAD-activiteit van een in 0.25 M sucrose bereid hersenhomogenaat en hieruit door centrifugatie bij 105.000 g verkregen fracties (activiteit in μl CO_2/u/ml).

	zonder toevoeging	+ propyleenglycol	+ β-oestradiol	+ stilboestrol
homogenaat	88	92	93	91
sediment	32	32	34	34
supernatant	45	46	52	47

Onlangs werd bekend (8, 9) dat de aanwezigheid van lecithine een noodzakelijk vereiste is voor de enzymatische dehydrogenering van het β-hydroxyboterzuur met uit zijn structuur losgemaakt enzym. Men veronderstelde dat het lecithine zou bijdragen tot het in stand houden van de tertiaire structuur van het enzym.

Het leek ons daarom interessant na te gaan in hoeverre lecithine het uit zijn structuur losgemaakte GAD zou beïnvloeden en of het in staat zou zijn de door desoxycholzuur veroorzaakte remming van het GAD in het supernatant 105.000 g op te heffen.

Wij gebruikten hiervoor eilecithine, gesuspendeerd in 0.1 M phosphaatbuffer pH 6.3 *).

Allereerst voegden wij desoxycholzuur toe aan de verschillende fracties welke van tevoren met lecithine waren geïncubeerd. De resultaten van dit experiment zijn in tabel 22 samengevat.

Vervolgens hebben wij lecithine toegevoegd aan de geïsoleerde fracties, welke vooraf met verschillende hoeveelheden desoxycholzuur waren geïncubeerd. Tabel 23 geeft de resultaten hiervan weer.

Experimenteel bleek dat bij de hoogste concentratie desoxycholzuur het gesuspendeerde lecithine geheel in oplossing ging. Uit beide tabellen volgt duidelijk dat het lecithine geen noemenswaardige

*) Het eilecithine werd ons welwillend ter beschikking gesteld door Dr G.J.M. Hooghwinkel, Laboratorium voor Medische Chemie, Rijksuniversiteit, Leiden, waarvoor wij bijzonder dank zijn verschuldigd.

invloed heeft op de GAD-activiteit, doch dat het in staat is de door desoxycholzuur veroorzaakte remming gedeeltelijk op te heffen. Het vóórincuberen met een der beide verbindingen heeft geen verschillende invloed op het uiteindelijke resultaat.

Tabel 22

Invloed van desoxycholzuur op de GAD-activiteit van sucrose-supernatants 105.000 g, waaraan verschillende hoeveelheden lecithine zijn toegevoegd.

(activiteit in μl CO_2/u/ml) (duplo-proeven)

hoeveelheid lecithine per ml supernatant	eindconcentratie desoxycholzuur					
	-		3×10^{-3} M		6×10^{-3} M	
	I	II	I	II	I	II
-	55	52	17	13	5	1
3.4 mg	44	44	25	23	17	15
5.1 mg	44	41	29	23	21	14
6.8 mg	47	45	31	28	24	18

Tabel 23

Invloed van lecithine op de GAD-activiteit van sucrose-supernatants 105.000 g, waaraan verschillende hoeveelheden desoxycholzuur zijn toegevoegd.

(activiteit in μl CO_2/u/ml) (duplo-proeven)

hoeveelheid lecithine per ml supernatant	eindconcentratie desoxycholzuur					
	-		3×10^{-3} M		6×10^{-3} M	
	I	II	I	II	I	II
-	53	55	13	18	5	0
3.4 mg	46	48	25	30	10	13
5.1 mg	45	52	26	33	15	16
6.8 mg	50	52	28	36	22	27

5. Discussie.

Een nadere beschouwing van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten doet inzien dat een directe bepaling van het GAD in de, uit

een 0.25 ml sucrose-homogenaat geïsoleerde, celfracties, niet tot een juist inzicht van de verdeling van het enzym over deze fracties leidt.

Uit tabel 15 blijkt dat een sucrose-homogenaat weliswaar zekere activiteit bezit, doch dat deze in vergelijking met een in water bereid homogenaat zeer laag ligt.

LØVTRUP (4) heeft zeer waarschijnlijk eveneens deze lage activiteit gevonden, hoewel hij dit niet expliciet vermeldt. Hij vindt dat ± 50 ml van een 15% rattenhersenhomogenaat 120 μM CO_2/2u/500 mg weefsel ontwikkelen. Dit zou overeenkomen met ongeveer 178 μl CO_2/u/500 mg weefsel. Hij werkte echter bij 30°C en voegde geen 2-mercaptoaethanol toe, hetgeen een verklaring zou kunnen zijn voor deze, vergeleken met de onze, nog lagere waarden.

Toevoegen van desoxycholzuur aan het sucrose-homogenaat deed de activiteit sterk oplopen. Dit versterkte ons in het reeds eerder gerezen vermoeden, dat een deel van het enzym in het sucrose-milieu aan resterende structuren gebonden is, hetgeen een belemmering vormt voor het ontwikkelen van een optimale enzymatische werking. Dit structuurgebonden enzym komt door de desoxycholzuurwerking vrij en geeft aanleiding tot een verhoogde activiteit in het milieu.

Naast deze werking van desoxycholzuur treedt echter ook een remming op, welke vooral duidelijk tot uiting komt bij toevoegen van deze verbinding aan het supernatant 105.000 g.

Ongetwijfeld zal deze remming ook een quantitatief niet gekende rol kunnen spelen bij de andere fracties, zodat het niet mogelijk is een nauwkeurige waarde te geven van de activiteit van ieder der fracties. Ondanks deze bezwaren kunnen wij toch wel een indruk krijgen van de plaats van het GAD in de cel. Uit onze gegevens menen wij te mogen concluderen dat er sterke aanwijzingen bestaan, dat het GAD gelocaliseerd is aan de in de kern + celwanddebris voorkomende structuren. Het feit dat bij fractioneren van zowel water- als sucrose-homogenaten een aanzienlijk deel van de activiteit in het supernatant wordt teruggevonden, wijst sterk in de richting van localisatie aan de celwand. Deze verliest uiteraard bij het homogeniseren voor een aanzienlijk deel zijn normale structuur en afhankelijk van de physisch-chemische eigenschappen van het homogenisatiemilieu zal een deel van het enzymatisch actieve eiwit in het milieu vrijkomen.

Behalve het desoxycholzuur blijkt ook het cholzuur in staat de activiteit van het sucrose-homogenaat te verhogen, terwijl deze stof eveneens een remmende werking op de GAD-activiteit van het supernatant uitoefent.

Het lecithine heeft geen invloed op de GAD-activiteit, doch is wel in staat de door desoxycholzuur veroorzaakte remming voor een deel op te heffen. Dit gaat tevens gepaard met een solubilisatie van het toegevoegde lecithine, zodat er reden is aan te nemen dat het lecithine door complexvorming met het aanwezige desoxycholzuur de remmende werking van deze verbinding vermindert. Voor een gedetailleerder omschrijving van deze interactie zullen uitvoeriger experimenten noodzakelijk zijn.

Samenvattend kunnen wij zeggen dat er sterke aanwijzingen bestaan dat het GAD gelocaliseerd is aan de celmembranen, terwijl er afhankelijk van het homogenisatiemedium een deel van het enzymatisch actief eiwit in oplossing gaat en als zodanig in het supernatant wordt aangetroffen.

De relatief zeer lage activiteit van de mitochondriën zou een gevolg kunnen zijn van een verontreiniging van deze fractie door weefsel uit de kern + debris-fractie, hetgeen door een ongeveer gelijk desoxycholzuureffect vrij aannemelijk wordt gemaakt.

Met deze gegevens in handen, menen ook wij de beweringen van McKHANN en TOWER, dat het GAD in de mitochondriën gelocaliseerd zou zijn, te kunnen weerleggen, doch volgens ons met meer recht van spreken dan LØVTRUP.

LITERATUUR

1. D.G. Simondsen, E. Roberts — Fed. Proc. 20, 239 (1961).
2. G.M. McKhann, R.W. Albers, L. Sokoloff, O. Mickelsen, D.B. Tower — Inhibition in the nervous system and γ-aminobutyric acid. Pergamon Press, London, 1960 p. 169.
3. G.M. McKhann, D.B. Tower — J.Neurochem. 7, 26 (1961).
4. S. Løvtrup — J.Neurochem. 8, 243 (1961).
5. T.M. Brody, J.A. Bain — J.Biol. Chem. 195, 685 (1952).
6. K.L. Yielding, G.M. Tomkins — Proc.Natl.Acad.Sci. 46, 1483 (1960).
7. K.L. Yielding, G.M. Tomkins — Proc.Natl.Acad.Sci. 47, 983 (1960).
8. I. Sekuzu, P. Jurtshuk, D.E. Green — Biochem.Biophys.Res.Comm. 6, 71 (1961).
9. P. Jurtshuk, I. Sekuzu, D.E. Green — Biochem.Biophys.Res.Comm. 6, 76 (1961).

V INTERACTIE VAN ENIGE VERBINDINGEN MET HET GAD

1. Inleiding.

In dit hoofdstuk zullen wij de experimenten bespreken waarbij de interactie van een aantal verbindingen met de enzymatische decarboxylering van het L-glutaminezuur is nagegaan.

Allereerst betreft dit de invloed van enige aan glutaminezuur en GABA verwante stoffen, vervolgens van enkele metaalbindende reagentia en tenslotte van twee op het centrale zenuwstelsel werkende pharmaca, met name van chloorpromazine en 2-aethyl-2-phenyl-glutaarimide (Doriden).

2. Invloed van enige aminozuren en van het γ-aminoboterzuuramide op het GAD.

Hoewel de invloed van een aantal aminozuren op de enzymatische decarboxylering van het L-glutaminezuur reeds eerder oriënterend is onderzocht (1, 2) leek het ons belangrijk deze interactie over een groter concentratiegebied te onderzoeken. Wij hebben ons hierbij echter beperkt tot enige verbindingen welke nauw aan het glutaminezuur of het GABA verwant zijn. Daarnaast is de werking van hoge concentraties GABA nagegaan.

Allereerst onderzochten wij de invloed van verschillende hoeveelheden asparaginezuur op het GAD. Uit tabel 24 blijkt dat deze stof een duidelijk remmende werking vertoont, geheel in overeenstemming met de door WINGO en AWAPARA (1) vermelde gegevens.

Bij het vermelden van de eindconcentraties der aminozuren is geen rekening gehouden met de oorspronkelijk in het supernatant aanwezige hoeveelheden van deze verbindingen. Een nauwkeurige K_i-bepaling van het asparaginezuur heeft zodoende in dit systeem nog weinig zin en krijgt pas waarde, wanneer wij de beschikking hebben over een verder gezuiverd enzym.

De sterke gelijkenis welke er echter tussen het asparaginezuur en het glutaminezuur bestaat doet ons vermoeden dat wij hier met een competitieve remming te maken hebben.

Tabel 24

GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g bij verschillende concentraties asparaginezuur.
Eindconcentratie glutaminezuur 6 x 10^{-2}M (I) en 5 x 10^{-2}M (II).

I		II	
eindconcentratie asparaginezuur	activiteit	eindconcentratie asparaginezuur	activiteit
-	(100)	-	(100)
5 x 10^{-3} M	96	7.5 x 10^{-3} M	85
1 x 10^{-2} M	90	1.5 x 10^{-2} M	75
2 x 10^{-2} M	81	3 x 10^{-2} M	68
3 x 10^{-2} M	74	4.5 x 10^{-2} M	62
4 x 10^{-2} M	68	6 x 10^{-2} M	59

Vervolgens onderzochten wij de invloed van enige amiden, met name van het glutamine, het asparagine en van het γ-aminoboterzuur-amide. Deze laatste verbinding hadden wij reeds eerder naar aanleiding van andere experimenten gesynthetiseerd. Wij hoopten dat dit amide evenals het glutamine, en in tegenstelling tot het GABA en het glutaminezuur, in staat zou zijn ongehinderd de bloedhersenbarrière te passeren en na desamidering aanleiding zou geven tot een verhoogd GABA-gehalte in de hersenen. Experimenten, waarbij getracht is met subcutane inspuitingen van dit amide door cardiazol opgewekte convulsies bij ratten tegen te gaan, hadden echter geen positief resultaat.

SYNTHESE γ-AMINOBOTERZUUR-METHYLESTER HCl.

5 g γ-aminoboterzuur werd in 100 ml absolute methanol gesuspendeerd en hierin werd onder koeling droog HCl gas geleid tot alles opgelost was. Direct hierna werd de oplossing in vacuo ingedampt tot de eerste kristallen verschenen. Door toevoeging van aether werd volledige kristallisatie verkregen.

Het methylester-hydrochloride werd omgekristalliseerd door oplossen in absolute methanol en toevoegen van aether tot de eerste kristallen zich vormden. De opbrengst bedroeg 5.4 g witte kristallen met een smeltpunt van 121°C.

(Analyse : Cl 23.0 %, $-OCH_3$ 21.1 %

Berekend : Cl 23.12 %, $-OCH_3$ 20.19 %)

SYNTHESE γ-AMINOBOTERZUURHYDRAZIDE HCl.

5.4 g γ-aminoboterzuur-methylester HCl werd opgelost in 17.5 ml aqua dest. en hieraan werd 2.8 ml hydrazinehydraat (85%) toegevoegd.

Dit werd gedurende een nacht bij 35°C weggezet. Hierna werd 50 ml absolute alcohol toegevoegd en de oplossing onder vacuum ingedampt tot kristallisatie optrad. Er werd nu nog 25 ml absolute alcohol toegevoegd en een volledige kristallisatie werd verkregen bij -20°C. Na affiltreren en drogen bedroeg de opbrengst 4.2 g witte kristallen met een smeltpunt van 149°C.

(Analyse : C 31.0 %, H 7.7 %, N 27.3 %
Berekend : C 31.27 %, H 7.82 %, N 27.36 %)

SYNTHESE γ-AMINOBOTERZUURAMIDE HCl.

4.2 g γ-aminoboterzuurhydrazide HCl werd opgelost in 90 ml aethanol (50 %) en hieraan werd 15 g vers geactiveerd Raney-nikkel toegevoegd. De oplossing werd gedurende 30 minuten onder terugvloeikoeling op een waterbad verwarmd en hierna tot 50°C afgekoeld. Na affiltreren en wassen van het residu werd aan het filtraat 15 ml van een dimethylglyoxim-suspensie in 50 % aethanol toegevoegd (15 g dimethylglyoxim op 200 ml 50 % aethanol). Het ontstane rode neerslag werd afgefiltreerd en de oplossing werd met weinig Norit gekookt en hierna gefiltreerd. De oplossing werd nu ingedampt in vacuo tot 100 ml en wederom gefiltreerd. Het filtraat werd vervolgens verder ingedampt. Zodra de eerste kristallen verschenen, werd aether toegevoegd om volledige kristallisatie te verkrijgen.
Omkristallisatie werd bereikt door oplossen in 96 % alcohol en neerslaan met aether. Het gewicht van het zuivere product (witte naaldjes) was 2.1 g, smeltpunt 138° C.

(Analyse : C 34.6 %, N 19.7 %, H 8.0 %, Cl 25.9 %
Berekend : C 34.66 %, N 20.22 %, H 7.94 %, Cl 25.63 %)

In tabel 25 zijn de gegevens samengevat welke wij verkregen bij toevoeging van bovengenoemde amiden aan een rattenhersenhomogenaat.

Tabel 25

GAD-activiteit van een rattenhersenhomogenaat bij verschillende concentraties glutamine, asparagine en γ-aminoboterzuuramide.

	eindconc. amide	eindconc. glutaminezuur	activiteit
glutamine	-	2×10^{-2} M	(100)
„	4×10^{-3} M	„	102
„	8×10^{-3} M	„	103
„	1.6×10^{-2} M	„	107
asparagine	-	2×10^{-2} M	(100)
„	3×10^{-3} M	„	95
„	6×10^{-3} M	„	92
„	1.2×10^{-2} M	„	88
γ-aminoboterzuuramide	-	6×10^{-2} M	(100)
„	5×10^{-3} M	„	102
„	1×10^{-2} M	„	99
„	2×10^{-2} M	„	97

Slechts bij toevoegen van asparagine zien wij een lichte remming optreden, welke misschien te wijten is aan de werking van het in de hersenen voorkomende asparaginase, hetgeen een omzetting van asparagine tot asparaginezuur bewerkt.

Het glutamine bleek evenals bij ROBERTS en FRANKEL (2) bij deze glutaminezuurconcentratie een kleine verhoging van activiteit te geven, hetgeen zij weten aan de aanwezigheid van glutaminase in het homogenaat.

Tot slot van deze reeks waarnemingen hebben wij de invloed van verschillende hoeveelheden GABA in het supernatant 105.000 g nagegaan. Deze gegevens zijn in tabel 26 samengevat.

Tabel 26

GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g bij verschillende concentraties GABA.

(Eindconcentratie glutaminezuur 3 x 10^{-2} M)

eindconcentratie GABA	activiteit	
	I	II
-	(100)	(100)
1.5 x 10^{-2} M	86	92
4.5 x 10^{-2} M	75	75
6 x 10^{-2} M	67	68

Zoals verwacht bleek het GABA bij hoge concentraties een remmende werking te vertonen, hoewel deze remming, bij een ten opzichte van glutaminezuur dubbele hoeveelheid GABA, slechts ongeveer 30% bedroeg.

Wanneer wij uit de gevonden remming door GABA en asparaginezuur conclusies willen trekken aangaande de werking van deze verbindingen in vivo, doen wij er goed aan te bedenken dat wij hier het geïsoleerde enzymsysteem hebben onderzocht en deze interacties in vivo zeer waarschijnlijk geheel anders verlopen, als gevolg van aanzienlijk lagere concentraties dezer verbindingen en snelle omzetting tot andere producten.

3. Invloed van enige metaalbindende reagentia.

Teneinde na te gaan in hoeverre metalen een rol spelen bij de

enzymatische decarboxylering van het L-glutaminezuur in hersenweefsel, werd de invloed van verseen (aethyleendiamine-tetra-acetaat), o-phenanthroline en NaCN op het GAD onderzocht.
De resultaten zijn in tabel 27 verzameld.

Tabel 27
Invloed van verseen, o-phenanthroline en NaCN op de GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g.

Toegevoegde verbinding	eindconcentratie	activiteit
-	-	(100)
verseen	2.5×10^{-3} M	99
"	5×10^{-3} M	97
"	1×10^{-2} M	98
o-phenanthroline	4×10^{-6} M	103
"	4×10^{-5} M	98
"	4×10^{-4} M	94
NaCN	1×10^{-5} M	98
"	1×10^{-4} M	87
"	5×10^{-4} M	70
"	1×10^{-3} M	49

Toevoegen van verseen of o-phenanthroline bleek geen duidelijke remming te veroorzaken, hetgeen er op wijst dat metalen zeer waarschijnlijk geen rol spelen bij de enzymatische reactie.

Het NaCN bleek sterk te remmen. Gezien de resultaten met verseen en o-phenanthroline lijkt het niet aannemelijk dat deze remming berust op een wegnemen van zware metalen. Veel waarschijnlijker is dat deze wordt veroorzaakt door een reactie met het pyridoxalphosphaat onder vorming van de cyanohydrineverbinding.

Samenvattend kunnen wij zeggen dat deze gegevens geen aanleiding geven te veronderstellen dat metalen een rol spelen bij de enzymatische decarboxylering van het L-glutaminezuur.

4. Invloed van chloorpromazine en 2-aethyl-2-phenylglutaarimide op het GAD.

Ondanks het feit dat er vele onderzoekingen verricht zijn over de invloed van het chloorpromazine (2-chloor-10-(3-dimethylaminopropyl)-phenothiazine) op het hersenmetabolisme, blijkt er weinig

bekend te zijn over een eventuele interactie van deze verbinding met het GAD uit hersenweefsel.

Zo is het o.a. van chloorpromazine bekend dat het de aerobe glycolyse en het ATP-ase in hersenhomogenaten remt (3).

Het grote aantal biochemische processen, welke door chloorpromazine worden beïnvloed, maken de opheldering van de pharmacologische werking van deze stof bijzonder moeilijk.

HADO (4) merkt terloops op dat het bekend is dat het chloorpromazine een activerende werking zou hebben op het GAD in supernatants, verkregen door centrifugatie van muizenhersenhomogenaten, terwijl JACOBI en medewerkers (5) in een voorlopige mededeling vermelden dat phenothiazinederivaten het GAD in homogenaten 2 – 3 voudig activeren bij een concentratie van $5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$ M.

OGURA (6) concludeert echter zonder nadere gegevens tot een, zowel in vivo als in vitro, remmende werking van het chloorpromazine op het GAD uit hersenweefsel.

GREENBERG en medewerkers (7) zagen na inspuitingen van chloorpromazine bij normale en vitamine B_6 deficiënte ratten geen invloed op het in vitro geteste GAD, doch wel een remming van het pyridoxalkinase.

Bij een eindconcentratie van 10^{-4} M chloorpromazine werd geen invloed waargenomen op de in vitro geteste decarboxylering van 5-hydroxytryptophaan en van 3,4-dihydroxyphenylalanine in supernatants van hersen- en nierweefsel van ratten (8).

De uiteenlopende bevindingen van deze onderzoekers, naast het feit dat hun gegevens bijzonder vaag zijn, vormden voor ons een aanleiding de invloed van het chloorpromazine op het GAD opnieuw en wel over een groter concentratiegebied na te gaan.

Wij voegden verschillende hoeveelheden van deze stof toe aan supernatants 105.000 g, welke al of niet voorzien waren van 2-mercaptoaethanol. De chloorpromazineoplossing werd eerst met NaOH op pH 6.3 gebracht. Het vormde echter een bezwaar dat er bij eindconcentraties van chloorpromazine hoger dan 10^{-4} M in het incubatiemengsel een neerslag van onbekende samenstelling ontstond, hetgeen zoals uit tabel 28 blijkt de concentraties zijn, waarbij deze stof een remmende werking gaat vertonen.

Uit de verkregen gegevens blijkt dat er bij lage concentraties chloorpromazine een geringe activering van de enzymatische activiteit in het supernatant, voorzien van 2-mercaptoaethanol, optreedt. In het geval van hetzelfde supernatant, doch nu zonder toevoeging van 2-mercaptoaethanol, blijkt deze activering echter veel groter te zijn.

Tabel 28

Invloed van chloorpromazine op de GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g met en zonder toevoegen van 2-mercaptoaethanol (eindconc. 4 x 10^{-3} M).

eindconcentratie chloorpromazine	+ MEA	- MEA
-	(100)	29
5 x 10^{-6} M	110	40
5 x 10^{-5} M	110	58
7.5 x 10^{-5} M	118	62
1 x 10^{-4} M	114	58
1 x 10^{-3} M	95	42
2 x 10^{-3} M	69	26

In beide gevallen treedt bij hoge eindconcentraties een remming op. Dit beeld van activering en remming bij de gegeven chloorpromazineconcentraties verkregen wij steeds en dit doet ons veronderstellen dat de werking van chloorpromazine hier berust op een reactiveren van het niet meer actieve apoenzym op een wijze welke gelijkenis vertoont met de werking van -SH verbindingen. Interessant is in dit verband het bekende sterke electronen-donor karakter van chloorpromazine (9)(vergelijk ook 10). Een interactie van het chloorpromazine met pyridoxalphosphaat kon door ons spectrophotometrisch niet worden aangetoond.

Uit het feit dat chloorpromazine zo te zien in vitro slechts een reactiverende rol speelt, vermoeden wij dat er in vivo geen interactie optreedt, hetgeen zou overeenstemmen met de ervaringen van GREENBERG en medewerkers (7).

Zeer waarschijnlijk is de activering welke JACOBI en medewerkers (5) en HADO (4) vermeldden een gevolg van het feit dat er gewerkt is met een oud homogenaat, zonder toevoeging van -SH verbindingen. Hun concentraties stemmen niet geheel overeen met de onze, waarbij het echter de vraag is of zij eindconcentraties bedoelen, hetgeen uit hun mededeling niet duidelijk wordt.

De door chloorpromazine veroorzaakte remming van het GAD in vitro, welke OGURA (6) vermeldt, is zeer waarschijnlijk veroorzaakt door de gebruikte hoge concentraties van deze verbinding.

Tenslotte hebben wij nog de invloed van 2-aethyl-2-phenylglutaarimide (Doriden) op de enzymatische decarboxylering onderzocht. Hoewel uit de literatuur geen gegevens bekend waren, leek een

mogelijke interactie van deze verbinding met het GAD ons op grond van de structuur van deze verbinding niet denkbeeldig.

Tabel 29 geeft een beeld van de hierbij verkregen resultaten.

Tabel 29

Invloed van 2-aethyl-2-phenylglutaarimide op de GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g.

eindconcentratie	activiteit	eindconcentratie	activiteit
-	(100)	1×10^{-4} M	93
1×10^{-5} M	100	2×10^{-4} M	95
5×10^{-5} M	95	4×10^{-4} M	93

Uit deze gegevens blijkt dat het Doriden bij de gebruikte concentraties geen invloed op het door ons onderzochte enzymsysteem vertoonde.

LITERATUUR

1. W.J. Wingo, J. Awapara — J.Biol.Chem. 187, 267 (1950).
2. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 190, 505 (1951).
3. J. Bernsohn, I. Namajuska, L.G. Cochrane — Arch.Biochem.Biophys. 62, 274 (1956).
4. T. Hado — Nagoya Med.J. 5, 45 (1959).
5. H.P. Jacobi, H. Haggstrom, D. Rosenberg, M. Kelly, M.J. Carver — Abstracts 5e Intern.Biochem. Congres Moskou 1961. p. 403.
6. Y. Ogura — Chem.Abstracts 55, 1920 g (1961).
7. S.M. Greenberg, T.Masurat, E.G. Rice, J.F. Herndon, E.J. v. Loon — Biochem.Pharmacol. 2, 308 (1959).
8. K.F. Gey, W.P. Burkard, A. Pletscher — Biochem.Pharmacol. 8, 383 (1961).
9. G. Karreman, I. Isenberg, A. Szent Györgyi — Science 130, 1191 (1959).
10. M. Wolleman, T. Keleti — Arzneimittel- Forsch. 12, 360 (1962).

VI INTERACTIE VAN HYDRAZIDES EN PYRIDOXALPHOSPHAATHYDRAZONEN MET HET GAD

1. Inleiding.

De remmende werking van hydrazides op het GAD uit hersenweefsel is in de literatuur meermalen beschreven (1 - 10). Men nam over het algemeen aan dat deze remming een gevolg is van de vorming van de desbetreffende hydrazonen van het pyridoxalphosphaat, gepaard gaande met een vermindering van activiteit van het enzym-coenzymcomplex. HADO (6) toonde aan dat het isonicotinoylhydrazide competitief met het substraat het GAD uit hersenweefsel remt.

Deze remming treedt in vitro op bij vele van pyridoxalphosphaat afhankelijke enzymreacties en eveneens, zoals McCORMICK en SNELL (11, 12) aantoonden, bij het pyridoxalkinase.

Gezien het feit dat het pyridoxalphosphaat als coenzym voor de decarboxyleringen en transamineringen in het hersenmetabolisme een zeer belangrijke functie vervult, is het begrijpelijk dat er zeker geen eenvoudig verband bestaat tussen in vivo ingebracht hydrazide en eventueel daarop volgende convulsies. Deze kunnen het gevolg zijn van een of meerdere gestoorde reacties, welke alleen of tezamen het waargenomen effect veroorzaken. Zeker is het ook niet zo, dat alle in vitro optredende reacties bij in vivo experimenten op dezelfde wijze verlopen, daar in het laatste geval vele andere factoren, zoals passage door de bloed-hersenbarrière en afbraak in de hersenen van het gebruikte hydrazide, mede een rol spelen.

In 1959 verschenen er publicaties van GONNARD en medewerkers (13, 14, 15) waarin de werking van enige hydrazonen van het pyridoxalphosphaat bij de decarboxylering van dihydroxyphenylalanine en bij het glutaminezuur-oxaalazijnzuurtransaminase werd beschreven. Zij werkten bij deze experimenten voornamelijk met het isonicoti-

noylhydrazon van pyridoxalphosphaat en ontdekten, dat toevoeging van deze verbinding aan de enzymsystemen een gelijke of iets hogere enzymatische activiteit opleverde dan bij gebruik van het natuurlijke coenzym i.c. pyridoxalphosphaat.

Zij slaagden er niet in een hydrolyse van het hydrazon in het incubatiemengsel aan te tonen en concludeerden uit de verkregen gegevens dat het hydrazon op dezelfde wijze als coenzym bij de enzymatische reactie werkte als het pyridoxalphosphaat zelf. Hieruit zou volgen dat de vrije aldehydegroep van het pyridoxalphosphaat, welke tot nu toe onontbeerlijk leek voor de coenzymatische activiteit, daar deze onder vorming van een Schiffse base reageert met het aminozuur, geen noodzakelijk vereiste zou vormen. Ook BONAVITA en SCARDI (16, 17) slaagden erin deze werking van het pyridoxalphosphaatisonicotinoylhydrazon op het glutaminezuur-oxaalazijnzuurtransaminase aan te tonen. Zij veronderstelden dat het hydraals zodanig gebonden wordt aan het apoenzym waarna een vervanging plaatsvindt van het hydrazidedeel door het substraat onder vorming van het normale enzym-substraatcomplex. Deze remming van het met de aldehydegroep van het pyridoxalphosphaat reagerende hydrazide, zou competitief met het substraat zijn. Naast deze competitieve remming van het hydrazide zou er echter bij hoge concentraties van deze verbindingen een niet-competitieve remming optreden, welke physiologisch geen rol zou spelen, daar deze concentraties in vivo onbereikbaar zijn.

Een verklaring voor de in vivo optredende remming bij van pyridoxalphosphaat afhankelijke enzymreacties door hydrazides zou gezocht moeten worden in een remming van het pyridoxalkinase. McCORMICK en SNELL (11, 12) toonden aan dat het pyridoxalkinase uit runderhersenen 1000 x sterker geremd werd door de hydrazides dan het GAD uit dit weefsel. In vivo zou als gevolg van deze remming minder pyridoxalphosphaat worden gevormd, hetgeen de oorzaak zou zijn van de lagere activiteit van de van dit coenzym afhankelijke enzymen.

Naar aanleiding van bovenstaande gegevens leek het ons nuttig een oriënterend onderzoek naar de werking van enige hydrazonen op het GAD te verrichten. Wij synthetiseerden hiertoe het benzoyl- en het isonicotinoylhydrazon van pyridoxalphosphaat en onderzochten de GAD-activiteit bij toevoeging van deze stoffen i.p.v. pyridoxalphosphaat. Tevens gingen wij na in hoeverre het GAD in aanwezigheid van het pyridoxalphosphaat of van een dezer hydrazonen geremd zou worden door toevoeging van enige hydrazides aan het incubatiemengsel.

2. Experimenteel gedeelte.

2.1 Synthese van het benzoyl- en het isonicotinoylhydrazon van pyridoxalphosphaat.

Voor de bereiding van deze beide hydrazonen werd de methode van GONNARD en NGUYEN CHI (13, 15) gevolgd.

Hiertoe werd een mengsel van equimolaire hoeveelheden pyridoxalphosphaat, opgelost in aqua dest., en het desbetreffende hydrazide, opgelost in aethanol, op een waterbad gedurende 1 uur onder terugvloeikoeling verwarmd. Na afkoeling werd het ontstane neerslag afgefiltreerd, gewassen met 50% aethanol en gedroogd.

Het benzoylhydrazon verkoolde bij 235° - 240°C, terwijl het isonicotinoylhydrazon ontleedde bij 257°C.

Chromatografisch leverden beide hydrazonen duidelijk één vlek op, verschillend van die van pyridoxalphosphaat.

Analyse: Pyridoxalphosphaatbenzoylhydrazon.

Berekend:	C 49.32 %,	H 4.38 %,	N 11.51 %,	P 8.29 %
Gevonden:	C 48.1 %,	H 5.0 %,	N 10.7 %,	P 8.2 %

Analyse: Pyridoxalphosphaatisonicotinoylhydrazon.

Berekend:	C 45.90 %,	H 4.10 %,	N 15.30 %,	P 8.47 %
Gevonden:	C 46.2 %,	H 4.8 %,	N 15.0 %,	P 7.8 %

Hoewel de analyses van deze beide hydrazonen niet bevredigend zijn, hebben wij gemeend bij dit oriënterend onderzoek van deze stoffen gebruik te kunnen maken, gezien ook de resultaten bij de chromatografie.

2.2 Bepaling van de GAD-activiteit bij toevoeging van enige hydrazonen.

Evenals GONNARD hebben wij nagegaan hoe de GAD-activiteit verliep wanneer wij pyridoxalphosphaat als coenzym vervingen door het benzoylhydrazon of isonicotinoylhydrazon van pyridoxalphosphaat. Wij gebruikten voor deze experimenten een supernatant van 105.000 g van een 20% rattenhersenhomogenaat, dat echter altijd nog een zekere hoeveelheid endogeen pyridoxalphosphaat bevatte.

Evenals het pyridoxalphosphaat werden de hydrazonen samen met het glutaminezuur vanuit het 1e zijvat toegevoegd.

Daar de beide hydrazonen in water slecht oplosbaar zijn, werden deze verbindingen opgelost in 0.1 M phosphaatbuffer pH 6.3.

In tabel 30 zijn de resultaten samengevat van een experiment waarbij wij de activiteit nagingen bij gebruik van verschillende hoeveelheden pyridoxalphosphaat of een der beide hydrazonen.

Tabel 30

GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g bij toevoegen van verschillende hoeveelheden pyridoxalphosphaat, pyridoxalphosphaatbenzoylhydrazon of pyridoxalphosphaatisonicotinoylhydrazon.

eindconcentratie toegevoegde verbinding	activiteit		
	pyridoxal-phosphaat	benzoyl-hydrazon	isonicotinoyl-hydrazon
7.5×10^{-5} M	(100)	94	110
7.5×10^{-6} M	97	81	92
3.8×10^{-6} M	87	57	76
1.5×10^{-6} M	77	37	54
7.5×10^{-7} M	65	31	40
-	30	30	30

Uit deze gegevens blijkt dat bij hoge concentraties der beide hydrazonen een activiteit gevonden wordt van dezelfde grootteorde als bij toevoegen van het pyridoxalphosphaat. Bij lagere concentraties blijken de activiteiten echter niet langer parallel te verlopen en bij gebruik van de hydrazonen aanmerkelijk lager te liggen dan bij het natuurlijk voorkomend coenzym.

Wij moeten bij de interpretatie van deze gegevens echter bedenken, dat er in het supernatant steeds een hoeveelheid pyridoxalphosphaat aanwezig is, waarmede geen rekening gehouden is bij het berekenen van de in de tabel vermelde eindconcentraties. De in de kolommen der hydrazonen vermelde activiteit is dus een gevolg van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid pyridoxalphosphaat (gemiddeld een endogene activiteit van 30% representerend) en de toegevoegde hoeveelheid hydrazon.

Het staat evenwel vast dat de toevoeging van de hydrazonen, evenals van het pyridoxalphosphaat, een duidelijke verhoging van activiteit veroorzaakt.

2.3 Remming van het GAD door hydrazides.

Het leek ons interessant na te gaan hoe de remming van het GAD door hydrazides verliep in aanwezigheid van het pyridoxalphosphaat of van een der beide hydrazonen.

Een directe vergelijking van de verkregen waarden met de in de literatuur vermelde gegevens over de hydrazide-remming in aanwezigheid van pyridoxalphosphaat is niet mogelijk, daar de concentraties van de verschillende componenten der incubatiemengsels niet geheel overeenstemmen.

Allereerst gingen wij de invloed na van het benzoylhydrazine op een supernatant 105.000 g van een rattenhersenhomogenaat. Wij hebben hieraan pyridoxalphosphaat of het pyridoxalphosphaat benzoylhydrazon tot een eindconcentratie van 7.5×10^{-5}M toegevoegd. Ook hier is bij het vermelden van deze eindconcentratie geen rekening gehouden met de reeds aanwezige hoeveelheid pyridoxalphosphaat in het supernatant, hetgeen eveneens voor alle volgende experimenten geldt.

In tabel 31 hebben wij de resultaten van dit experiment vermeld.

Tabel 31

GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g, waaraan pyridoxalphosphaat of pyridoxalphosphaatbenzoylhydrazon is toegevoegd (eindconc. 7.5×10^{-5}M), bij wisselende hoeveelheden benzoylhydrazine.

eindconcentratie benzoylhydrazine	activiteit	
	+ pyridoxalphosphaat	+ benzoylhydrazon
-	(100)	98
7.5×10^{-5} M	95	95
7.5×10^{-4} M	84	92
3.8×10^{-3} M	64	64
7.5×10^{-3} M	53	53
7.5×10^{-2} M	11	5

De verkregen resultaten geven een gelijke mate van remming te zien bij gebruik van het pyridoxalphosphaat of het hydrazon. Ook hier blijkt weer duidelijk dat bij het hydrazon zonder toevoeging van het hydrazide een gelijke activiteit gevonden wordt als bij toevoeging van het natuurlijke coenzym.

Vervolgens hebben wij hetzelfde experiment verricht, werkend met het pyridoxalphosphaatisonicotinoylhydrazon en isonicotinoylhydrazine. HCl. De hydrazide-oplossingen werden vooraf met NaOH op pH 6.3 gebracht.

De hierbij verkregen gegevens zijn in tabel 32 samengevat.

Tabel 32

GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g, waaraan pyridoxalphosphaat of pyridoxalphosphaatisonicotinoylhydrazon is toegevoegd (eindconc. 7.5×10^{-5}M), bij wisselende hoeveelheden isonicotinoylhydrazine.HCl.

eindconcentratie isonicotinoylhydrazine	activiteit	
	+ pyridoxal phosphaat	+ isonicotinoyl-hydrazon
-	(100)	109
7.5×10^{-5} M	104	102
7.5×10^{-4} M	90	86
3.8×10^{-3} M	63	66
7.5×10^{-3} M	45	52
7.5×10^{-2} M	14	16

Ook hier zien wij geen duidelijk verschil tussen de beide gebruikte verbindingen in de mate van remming door het hydrazide.

Tot slot van deze serie waarnemingen hebben wij de invloed van het semicarbazide.HCl op het GAD onderzocht in aanwezigheid van het pyridoxalphosphaat of een der beide hydrazonen.

De semicarbazide.HCl-oplossingen werden vooraf met NaOH op pH 6.3 gebracht.

Tabel 33 geeft een beeld van de verkregen resultaten.

Tabel 33

GAD-activiteit van een supernatant 105.000 g, waaraan pyridoxalphosphaat of een der hydrazonen is toegevoegd (eindconc. 7.5×10^{-5} M), bij wisselende hoeveelheden semicarbazide.HCl.

eindconcentratie semicarbazide	activiteit		
	+ pyridoxal-phosphaat	+ benzoyl-hydrazon	+ isonicotinoyl hydrazon
-	(100)	97	99
7.5×10^{-5} M	94	81	84
1.5×10^{-4} M	77	74	79
3.8×10^{-4} M	71	67	73
7.5×10^{-4} M	67	61	63
7.5×10^{-3} M	13	24	17

Het blijkt dat ook hier de remming in alle gevallen eenzelfde verloop vertoont, waarbij het duidelijk opvalt dat het semicarbazide een sterker remmende werking heeft dan de beide eerder geteste hydrazides.

Bij het overzien van deze gegevens blijkt duidelijk dat ook bij het GAD een toevoegen van deze pyridoxalphosphaathydrazonen leidt tot een bereiken van de optimale enzymatische activiteit.

Tevens blijkt er geen duidelijk verschil op te treden tussen de werking van het pyridoxalphosphaat en die der hydrazonen bij een door hydrazide veroorzaakte remming. Dit doet ons vermoeden dat althans een deel van beide reacties via dezelfde tussenproducten verloopt en dat dit gedeelte beïnvloed wordt door de toegevoegde hoeveelheden hydrazides.

Verreikende conclusies over de werking van de hydrazonen op het GAD lijken ons gezien de geringe omvang van dit oriënterende onderzoek niet gerechtvaardigd.

Het blijkt echter dat onze resultaten niet in strijd zijn met de door BONAVITA en SCARDI (16, 17) geopperde veronderstelling, dat er hier sprake is van een vervanging van het hydrazide-deel van het pyridoxalphosphaathydrazon door het substraat onder vorming van het normale enzym-substraatcomplex.

Het is de vraag of de zeer geringe hoeveelheid hydrazide en de eveneens geringe hoeveelheid Schiffse base, welke het pyridoxalphosphaat met het subtraat bij deze reactie vormt, aantoonbaar zijn, daar wij veronderstellen dat deze reactie slechts op de enzymatisch actieve plaats van het eiwit verloopt. Volgens ons blijft een dergelijke reactieve vervanging nog de meest aanvaardbare verklaring van de waargenomen feiten. (vgl. ook 18, 19, 20).

Een uitgebreid onderzoek naar de competitieve remming door hydrazides en naar de veronderstelde niet-competitieve remming van deze verbindingen bij hogere concentraties zal voor een bevestiging van deze hypothese echter noodzakelijk zijn. Hiervoor zal het gewenst zijn dat wij kunnen beschikken over een zuiverder enzym dan het bij deze oriënterende proeven gebruikte preparaat, terwijl het de voorkeur zal verdienen dat dit vrij is van endogeen pyridoxalphosphaat.

LITERATUUR

1. W.J. Wingo, A. Awapara — J.Biol.Chem. 187, 267 (1950).
2. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 188, 789 (1950).
3. E. Roberts, S. Frankel — J.Biol.Chem. 190, 505 (1951).
4. A.N. Davison — Biochim.Biophys.Acta 19, 131 (1956).
5. T. Hado — Nagoya Med.J. 5, 45 (1959).
6. T. Hado — Nagoya Med.J. 5, 203 (1959).
7. H. Balzer, P. Holtz, D. Palm — Arch.Exp.Pathol.Pharmakol. 239, 520 (1960).
8. K.F. Killam, J.A. Bain — J.Pharm.Exp.Therap. 119, 255 (1957).
9. K.F. Killam — J.Pharm.Exp.Therap. 119, 263 (1957).
10. C.F. Baxter, E. Roberts — Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 104, 426 (1960).
11. D.B. McCormick, E.E. Snell — Proc.Natl.Acad.Sci. 45, 1371 (1959).
    J.Biol.Chem. 236, 2085 (1961).
12. D.B. McCormick, B.M. Guirard, E.E. Snell — Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 104, 554 (1960).
13. P. Gonnard, J.P. Nguyen Chi — Bull.Soc.Chim.Biol. 41, 1455 (1959).
14. P. Gonnard, C. Nguyen-Philippon — Enzymol. 20, 231 (1959).
15. P. Gonnard, J.P. Nguyen Chi — Enzymol. 20, 237 (1959).
16. V. Bonavita, V. Scardi — Biochem.Pharmacol. 2, 58 (1959).
17. V. Bonavita — Arch.Ital.Biol. 99, 191 (1961).
18. W.T. Jenkins, I.W. Sizer — J.Am.Chem.Soc. 79, 2655 (1957).
19. I.G.Y. Matsuo, D.M. Greenberg, — J.Biol.Chem. 230, 561 (1958).
20. W.B. Dempsey, H.N. Christensen — J.Biol.Chem. 237, 1113 (1962).

VII CONCLUSIES EN SAMENVATTING

Onze bestudering van het GAD uit hersenweefsel vormt een onderdeel van een serie onderzoekingen, welke op ons laboratorium worden verricht aan een aantal van vitamine B_6 afhankelijke enzymen, waarvan enige verantwoordelijk zijn voor de vorming van pharmacologisch actieve aminen.

De belangrijkste onderdelen van dit onderzoek betreffen de zuivering van het enzym en de bepaling van de intracellulaire localisatie.

In hoofdstuk II wordt een korte samenvatting gegeven van de literatuur welke handelt over de rol van het GAD in het hersenmetabolisme, terwijl hierbij tevens de enzymsystemen worden betrokken welke voor de afbraak van het GABA verantwoordelijk zijn. Wij hebben hiermede getracht een indruk te geven van de rol van het glutaminezuur en van het GABA in het hersenweefsel, terwijl ook aan de functie van het vitamine B_6 aandacht wordt besteed.

Hoofdstuk III vangt aan met een kort overzicht van de literatuurgegevens, betreffende de isolering, zuivering en activiteitsbepaling van het GAD uit verschillende plantaardige en dierlijke weefsels. Na een beschrijving van de door ons gevolgde methode van isolering van het enzym uit dierlijke hersenen, waarvoor vooral rattenhersenen in aanmerking kwamen, volgt een uiteenzetting over de gebruikte methodiek ter bepaling van de enzymactiviteit.

Bij inleidende experimenten, welke dienden om onze methoden met de literatuurgegevens te kunnen vergelijken, konden wij bevestigen dat -SH groepen bij de GAD-werking zijn betrokken.

Het gebruik van cysteine als reducerend agens voldeed niet, daar deze verbinding in reactie treedt met het pyridoxalphosphaat onder vorming van een thiazolidinecarbonzuurderivaat, hetgeen een remming van het GAD veroorzaakt bij lage substraatconcentraties. Dit bracht ons er toe aan het incubatiemengsel steeds 2-mercaptoaethanol toe te voegen, hetgeen als reductiemiddel zonder ongewenste bij-reacties uitstekend voldeed.

Bij onze zuivering gingen wij uit van een rattenhersenhomogenaat met een GAD-activiteit van ongeveer 450 μl CO_2/u/500 mg weefsel,

hetgeen zeer goed overeenkomt met de tot nu toe in de literatuur vermelde activiteit van het GAD uit dit weefsel.

Hieruit bereidden wij een supernatant 105.000 g met een activiteit van 20 μl CO_2/u/mg eiwit. Door neerslaan van het eiwit bij pH 5.0 en opname in buffer verkregen wij een eiwitoplossing met een specifieke activiteit van ongeveer 40 μl CO_2/u/mg eiwit hetgeen echter gepaard ging met een ernstig verlies aan totale enzymactiviteit.

Het slecht in oplossing gaan van het bij deze zuiveringspogingen neergeslagen enzymatisch actieve eiwit vormde een groot probleem, waarop trouwens in de literatuur ook anderzijds is gewezen.

In hoofdstuk IV hebben wij een aantal experimenten beschreven welke ons een indruk geven van de intracellulaire localisatie van het GAD. Vergelijking van de enzymatische activiteit van in 0.25 M sucrose resp. in water bereide homogenaten en van de door centrifugatie hieruit verkregen celfracties deed ons vermoeden, dat een deel van het enzymatisch actieve eiwit in eerstgenoemd milieu niet optimaal werkzaam was. Wij onderstelden dat dit veroorzaakt zou kunnen zijn doordat onder deze omstandigheden een deel van het enzym nog gebonden was gebleven aan zijn oorspronkelijke drager, evenwel niet actief door beschadiging hiervan tijdens het homogeniseren. Vrijmaking van het enzym, b.v. met behulp van desoxycholaat zou dan het normale activiteitsniveau (als in waterhomogenaat) kunnen herstellen.

Dit bleek inderdaad aldus mogelijk, waarbij de verhoging van de activiteit ook het meest uitgesproken was bij de kern + celwand-debris-fractie.

Een remming van het GAD door desoxycholaat in hogere concentraties, met name in het supernatant, kon door toevoeging van lecithine ten dele worden opgeheven.

De mitochondriën-fractie vertoonde hoegenaamd geen GAD-activiteit en dit doet ons ernstig twijfelen aan de juistheid van de in de literatuur geopperde veronderstelling dat het GAD in de mitochondriën gelocaliseerd zou zijn. Op grond van onze gegevens menen wij dat er sterke aanwijzingen zijn dat het GAD in vivo aan de celwand gebonden is en bij homogeniseren van het weefsel voor een belangrijk deel in het bij hoog toerental verkregen supernatant terechtkomt.

Enige experimenten, waarbij de interactie van een aantal verbindingen met het GAD is nagegaan, hebben wij in hoofdstuk V samengevat.

Asparaginezuur en GABA bleken beide het GAD sterk te remmen, terwijl glutamine, aparagine en γ-aminoboterzuuramide het enzymsysteem nauwelijks beïnvloedden.

Uit experimenten met metaalbindende reagentia, zoals verseen en o-phenanthroline, bleek dat metalen zeer waarschijnlijk geen rol spelen bij de enzymatische reactie.

Terwijl het 2-aethyl-2-phenylglutaarimide geen interactie vertoonde, reactiveerde het chloorpromazine het enzym, vooral in afwezigheid van het 2-mercaptoaethanol (zie stelling 2).

De invloed van enige hydrazides en pyridoxalphosphaathydrazonen op het GAD vormt het onderwerp van hoofdstuk VI.

Naar aanleiding van de in de literatuur vermelde gegevens dat hydrazonen van pyridoxalphosphaat bij enige decarboxylasen en transaminasen eenzelfde functie kunnen vervullen als het natuurlijke coenzym, gingen wij de interactie van enige van deze verbindingen met het GAD na.

Hierbij bleek dat het benzoyl- en het isonicotinoylhydrazon van pyridoxalphosphaat het pyridoxalphosphaat kunnen vervangen met behoud van de activiteit.

De door hydrazides veroorzaakte remming vertoonde hetzelfde verloop in aanwezigheid van pyridoxalphosphaat of van een der beide hydrazonen.

Hoewel het proevenmateriaal nog gering is, menen wij toch dat er aanwijzingen zijn dat hier sprake is van een vervanging van het hydrazide-deel van het pyridoxalphosphaathydrazon door het substraat aan het enzym-oppervlak, resulterend in het normale enzym-substraatcomplex.

Samenvattend kunnen wij zeggen dat het ons is gelukt een basis te leggen voor enige meer gespecialiseerde onderzoekingen over het GAD uit hersenweefsel. Bij voortgezet onderzoek zal een nog verder gezuiverd enzympreparaat een eerste vereiste zijn, terwijl een bevestiging van onze aanwijzingen ten aanzien van de intracellulaire localisatie van het enzym ongetwijfeld een bijdrage kan vormen tot een beter begrip van de rol van het GAD in het hersenmetabolisme.

SUMMARY

The examination of brain-tissue GAD described in this dissertation is part of a series of investigations being carried out in our laboratory on a number of vitamin B_6-dependent enzymes, of which some are responsible for the production of pharmacologically active amines. The most important parts of the study concern the purification of the enzyme and the determination of its intracellular localisation.

In chapter II a short summary is given of the literature relevant to the role of GAD in brain metabolism and of the enzyme systems responsible for the degradation of GABA. An attempt is made to indicate the role of glutamic acid and of GABA in brain tissue, and the function of vitamin B_6 is also briefly described.

Chapter III begins with a short résumé of the data in the literature concerning the isolation, purification and determination of the activity of GAD from various plant and animal tissues. A description of the method used for the extraction of the enzyme from animal brain, especially rat brain, is followed by an exposition of the method for determination of the enzyme activity.

In preliminary experiments, serving to enable us to compare our methods with published data, we were able to establish that -SH groups are involved in the action of GAD.

The use of cysteine as reducing agent was unsatisfactory, since this compound reacts with pyridoxal phosphate to form a derivative of thiazolidine carboxylic acid, resulting in an inhibition of GAD at low substrate concentrations. 2-Mercapto-ethanol was therefore always added to the incubation mixture, and proved to be a very suitable reducing agent, free from undesirable side-reactions.

The starting material for the purification was a homogenate of rat brains with a GAD activity of approximately 450 μl CO_2/hr/500 mg tissue, which agrees well with reported values for the activity of GAD from this tissue. A 105.000 g supernatant was obtained from it which had an activity of 20 μl CO_2/hr/mg protein. By precipita-

tion of the protein at pH 5.0 and re-solution in buffer a solution with a specific activity of about 40 μl CO_2/hr/mg protein was obtained, unfortunately at the cost of a serious loss of total enzyme activity.

The poor solubility of the enzymatically active protein, precipitated in the course of these attempts at purification, constituted a major problem, a problem noted for that matter by other workers.

In chapter IV several experiments are described which gave an impression of the intracellular localisation of GAD. Comparison of the enzymatic activity of the homogenate in 0.25 M sucrose and in water respectively and of the cell fractions obtained from these by centrifugation led to the suspicion that a portion of the enzymatically active protein was not at optimum activity in the firstnamed medium. We postulated that this could have been caused by the protein being still bound under these conditions to its original carrier, which had become inactive because of damage during homogenisation. Liberation of the enzyme e.g. by means of desoxycholate, would therefore restore the normal level of activity (as in the aqueous homogenate). In support of this hypothesis, the activity was most markedly enhanced in the nucleus and cell wall débris fraction.

An inhibition of GAD with desoxycholate at higher concentrations, namely in the supernatant, could be partially counteracted by the addition of lecithin.

The mitochondria fraction showed no GAD activity whatsoever, and this makes the correctness of the assumption in the literature that GAD activity is located in the mitochondria extremely dubious. On the basis of our results we believe that there are strong indications that GAD is bound to the cell wall in vivo and that after homogenisation of the tissue and high-speed centrifugation it is to be found for the most part in the supernatant.

In chapter V experiments are reported which were carried out to examine the interaction of a number of compounds with GAD. Both aspartic acid and GABA appeared to have strong inhibitory effect, while glutamine, asparagine and γ-aminobutyramide scarcely affect the enzyme system. From experiments with metal-binding reagents such as versene and o-phenanthroline it was concluded that metals probably play no part in the enzymatic reaction. While 2-ethyl-2-phenylglutarimide showed no interaction with the enzyme, the

latter was reactivated by chloropromazine, especially in the absence of 2-mercapto-ethanol.

The influence of certain hydrazides and pyridoxal phosphate hydrazones on GAD is treated in chapter VI. These investigations were prompted by reported data showing that hydrazones of pyridoxal phosphate can fulfil the function of the natural coenzyme for some decarboxylases and transaminases. It was shown that the benzoyl- and isonicotinoyl hydrazones of pyridoxal phosphate can replace the latter as far as activity is concerned.

The inhibition brought about by hydrazides was identical in the presence of pyridoxal phosphate and of either of the hydrazones. Although the amount of evidence is still limited, we believe that these results indicate a replacement of the hydrazide portion of the pyridoxal phosphate hydrazone by the substrate at the surface of the enzyme, resulting in the formation of the normal enzyme-substrate complex.

In summary it can be stated that we have succeeded in laying the foundations for more specialized examination of brain-tissue GAD.

In future investigations the first requirement will be a still purer enzyme preparation, while confirmation of our findings concerning the intracellulair localisation of the enzyme would form a significant contribution to a better understanding of the role of GAD in brain metabolism.

Op verzoek van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde volgt hier een overzicht van mijn academische studie.

Na het behalen van het einddiploma Gymnasium β in 1949 aan het Stedelijk Gymnasium te Leiden, begon ik in september van hetzelfde jaar mijn studie aan de Rijksuniversiteit te Leiden.

In juli 1953 werd het candidaatsexamen scheikunde, letter F', afgelegd.

Mijn verdere studie geschiedde onder leiding van de hoogleraren Dr H. Veldstra, Dr E. Havinga en Dr S.E. de Jongh.

Van september 1954 tot juli 1955 was ik als leraar werkzaam op het St. Bonaventura Lyceum te Leiden.

In september 1955 volgde mijn benoeming tot assistent op het Biochemisch Laboratorium te Leiden. Het doctoraalexamen met hoofdvak biochemie en bijvakken organische chemie en pharmacologie werd in oktober 1956 afgelegd.

Tijdens het vervullen van mijn militaire dienstplicht, welke in februari 1957 een aanvang nam, was ik van oktober 1957 tot november 1958 als chemicus aan het klinisch-chemisch laboratorium van het Centraal Militair Hospitaal "Oog in Al" te Utrecht verbonden.

In november 1958 volgde mijn benoeming tot hoofdassistent op het Biochemisch Laboratorium te Leiden, in welke functie ik momenteel nog werkzaam ben.

Gaarne wil ik mijn dank betuigen aan allen die op enigerlei wijze, direct of indirect, hebben bijgedragen aan het totstandkomen van dit proefschrift.

In het bijzonder geldt dit voor Mej. I.G. Kramer, terwijl ik tevens hierin wil betrekken Mej. Drs. W. de Boer, Mej. I. van Wijngaarden en Drs. C. Kammeraat voor hun aandeel in het experimentele werk.

Veel dank ben ik eveneens verschuldigd aan het personeel van de dierenstallen van het Pharmacologisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Leiden, dat ons het proefmateriaal leverde.

De Heer F. Passchier verzorgde het tekenwerk, terwijl de Heer C.M. van Tol het photografische werk verrichtte.

STELLINGEN

I De overwegingen welke Wright voeren tot de hypothese dat alle enzymen een deel of een polymeer zijn van één der drie z.g. basiseiwitten zijn aanvechtbaar.

S.T.C. Wright Nature 193, 334 (1962).

II De reactiverende werking van het chloorpromazine op het glutaminezuurdecarboxylase in vitro gaat zeer waarschijnlijk gepaard met een oxydatie van dit agens.

M. Wollemann, T. Keleti Arzneimittel-Forsch. 12, 360 (1962).
Hoofdstuk V van dit proefschrift.

III Er zijn sterke aanwijzingen dat bij de enzymatische transaminering van aminozuren de α-carboxylgroep zich in en bij de enzymatische decarboxylering zich uit het vlak van het pyridoxalphosphaat-aminozuurcomplex bevindt.

A.E. Braunstein The Enzymes (Ed. P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck) New-York 1960 Vol.2, p. 113.
C. Cennamo Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 37, 183, 187 (1961).

IV Bij de spectrophotometrische bepaling van bilirubine in serum, zoals o.a. door Chiamori en medewerkers beschreven, wordt niet voldoende rekening gehouden met een mogelijke storende invloed van andere in het serum voorkomende verbindingen.

N. Chiamori, R.J. Henry, O.J. Golub Clin. Chim.Acta 6, 1 (1961).

V Het gebruik van een photometrisch eindpunt bij de amylase bepaling in serum volgens de "amyloclastic" methode van Somogyi, zoals door Reif en Nabseth voorgesteld, is aan bedenkingen onderhevig.

M. Somogyi Clin.Chem. 6, 23 (1960).
A.E. Reif, D.C. Nabseth Clin.Chem. 8, 113 (1962).

VI Bij het zoeken naar een mogelijke verklaring van de door Nieweg gesignaleerde anaemie en polyneuritis gravidarum tijdens de zwangerschap moet mede rekening worden gehouden met het relatief laag vitamine-B_6 gehalte van het bloed van de moeder.

H.O. Nieweg Ned.Tijdschr.Geneesk. 106, 523 (1962).
M. Wachstein, J.D. Kellner, J.M. Ortiz Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 103, 350 (1960).

VII De door Put en Hogenhuis verkregen resultaten doen vermoeden dat toediening van propylthiouracil aan ratten een directe invloed heeft op het serotonine-gehalte der hersenen.

T.R. Put, L.A.H. Hogenhuis Acta Physiol. Pharmacol.Neerlandica 10, 343 (1962).

VIII Bij de kolomscheiding van natuurlijk voorkomende mengsels van macromoleculen in klassen van verbindingen, verdient een elutie met een discontinue gradient meestal de voorkeur boven die met een continue gradient.

K.C. Smith, S. Rebhun, H.S. Kaplan Anal. Biochem. 1, 202 (1960).

IX Men dient rekening te houden met de mogelijkheid dat er naast het z.g. "messenger RNA" een hiervan afwijkend, laag moleculair RNA voorkomt, hetwelk een voorloper is van het hoogmoleculaire ribosomale RNA.

E. Otaka, S. Osawa, Y. Oota, A. Ishihama, H. Mitsui Biochim.Biophys.Acta 55, 310 (1962).

X Het opnemen in wetenschappelijke tijdschriften van voorlopige mededelingen, welke niet binnen korte tijd worden gevolgd door een uitvoerig gedocumenteerde publicatie, heeft dikwijls geen nuttig effect en dient om deze reden sterk te worden beperkt.